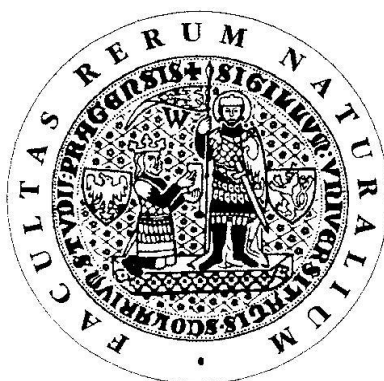


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



Bc. Marek Ladislav

Vliv morfinu na distribuci signálních molekul opioidního systému
v lipidových raftech izolovaných z myokardu potkana

The effect of morphine on the distribution of signaling molecules
of the opioid system in lipid rafts prepared from rat heart

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 5. května 2013

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za jeho pomoc, ochotu a trpělivé vedení při psaní této diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat své rodině, přátelům a spolupracovníkům za podporu a cenné rady.

Abstrakt

Morfin je opioidní agonista, u kterého bylo pozorováno kardioprotektivní působení. Lipidové rafty jsou považovány za platformy důležité pro membránovou organizaci signalizačních proteinů, a proto by tyto struktury mohly hrát roli i v účincích morfinu, který působí na opioidní receptory. Cílem této diplomové práce bylo sledovat distribuci hlavních komponent $G_{i/o}$ signální dráhy opioidních receptorů v lipidových raftech izolovaných z myokardu potkanů ovlivněných různými dávkami morfinu. Z důvodů použití odlišných technik izolace pomocí extrakce různými solubilizačními látkami (Triton X-100, CHAPS, cholát a uhličitan sodný) byla v práci zahrnuta i charakterizace takto připravených lipidových raftů. Úkolem bylo také zjistit, jak způsob izolace těchto struktur ovlivní aktivitu adenylátcyklázy jakožto klíčového cílového enzymu opioidní signální dráhy.

Přítomnost signálních molekul $G_{i/o}$ /AC dráhy opioidního systému v membránových raftech byla potvrzena a míra distribuce těchto proteinů byla závislá na typu použitého extrakčního činidla. Byl také pozorován vliv morfinu na lokalizaci sledovaných proteinů. Docházelo také k rozdílné míře solubilizace proteinů jednotlivými extrakčními činidly. Bylo zjištěno, že funkčnost katalytické aktivity adenylátcyklázy v lipidových raftech nejlépe zachovává cholát.

Závěrem lze shrnout, že použitá technika solubilizace má zásadní význam pro složení získaných raftů, a že morfin částečně ovlivňuje asociaci signálních molekul opioidní dráhy s těmito membránovými útvary.

Klíčová slova: membránové mikrodomény, solubilizace myokardu, morfin, $G_{i/o}$ protein, adenylátcykláza, opioidní receptor

Abstract

Morphine is an opioid agonist, which can exert cardioprotective effects under certain conditions. Lipid rafts are considered important platforms for membrane organization of signaling proteins and, therefore, these structures could play a role in the effects of morphine, which acts through the opioid receptors. The aim of this thesis was to investigate the distribution of the main components of the opioid receptor and $G_{i/o}$ -mediated signaling pathway in lipid rafts isolated from rat myocardium, which was affected by various doses of morphine. Because we used different isolation techniques with different solubilization agents (Triton X-100, CHAPS, cholate and sodium carbonate) for preparation of lipid rafts, it was of interest to characterize more closely these preparations. Another aim of this study was to investigate how different methods of isolating these structures affect activity of the key target enzyme of the opioid signaling pathway, i.e. adenylyl cyclase.

The presence of signaling molecules of the $G_{i/o}$ /AC pathway of the opioid system in membrane rafts was confirmed and the distribution of selected proteins was dependent on the type of extractant. We also observed the effect of morphine on the localization of proteins in lipid rafts. Different extractants provided different degree of solubilization of proteins. It was found that functional activity of adenylyl cyclase in lipid rafts was best preserved by cholate.

We conclude that the technique of solubilization is essential for the composition of obtained rafts, and that morphine may partially affect the association of signaling molecules of the opioid signaling pathways within these membrane formations.

Keywords: membrane microdomains, solubilization of myocardium, morphine, $G_{i/o}$ protein, adenylyl cyclase, opioid receptor

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod.....	10
2 Literární přehled.....	11
2.1 Modulační srdeční činnosti	11
2.2 Morfin	13
2.3 Lipidové rafty	15
2.4 Opioidní receptory	17
2.4.1 Rozdělení, zařazení a struktura.....	17
2.4.2 OR v myokardu	21
2.4.3 Signalizace.....	21
2.4.4 Adenylátcykláza	24
2.4.5 Signalizace a působení OR v myokardu.....	26
2.4.6 Desenzitizace, internalizace a downregulace	27
3 Cíle diplomové práce	32
4 Materiály a metody.....	33
4.1 Chemikálie	33
4.2 Roztoky.....	34
4.3 Experimentální zvířata.....	34
4.4 Homogenizace, frakcionace.....	35
4.4.1 Roztoky.....	35
4.4.2 Pracovní postup	35
4.5 Solubilizace a jednokroková izolace lipidových raftů (DRM)	36
4.5.1 Roztoky.....	36
4.5.2 Pracovní postup	36
4.6 Stanovení množství proteinů	37
4.6.1 Roztoky.....	37

4.6.2	Pracovní postup	37
4.7	SDS-PAGE elektroforéza a Western blotting	38
4.7.1	Roztoky	38
4.7.2	Pracovní postup	39
4.8	Stanovení aktivity adenylátcyklázy	41
4.9	Roztoky	41
4.10	Pracovní postup	41
5	Výsledky	43
5.1	Koncentrace proteinů v izolovaných frakcích	43
5.2	Charakterizace lipidových raftů	43
5.3	Vliv morfinu na zastoupení signálních molekul v lipidových raftech	45
5.3.1	KOR	46
5.3.2	DOR	48
5.3.3	$G_{\alpha_{i1/2}}$	50
5.3.4	G_{α_o}	52
5.3.5	$G\beta$	54
5.3.6	AC	56
5.4	Stanovení basální a stimulované aktivity AC	56
6	Diskuze	58
7	Závěr	65
	Seznam použité literatury	66

Seznam použitých zkratk

[³ H]cAMP	[³ H] značený cyklický adenosinmonofosfát
[α - ³² P]ATP	[α - ³² P] značený adenosintrifosfát
[α - ³² P]cAMP	[α - ³² P] značený cyklický adenosinmonofosfát
AA	Acris Antibodies
AC	adenylátcykláza
APS	peroxosíran amonný
AR	adrenergní receptor
ATP	adenosintrifosfát
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	hovězí sérový albumin
CAMK	kináza závislá na Ca ²⁺ /kalmodulinu
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD	diferenční skupina
DAG	diacylglycerol
DALA	(D-Ala ²)-Met-enkefalinamid
DAMGO	[D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol]-enkefalin
DOR	δ (delta) opioidní receptor
DRM	detergent rezistentní membrány
ERK	extracelulárně regulovaná kináza
GE-H	GE Healthcare
GM3	monosialogangliosid typu 3
GPCR	receptory spřažené s G-proteinem
GPI	glykofosfatidylinositol
GRK	kinázy receptorů spřažených s G-proteinem
GTP	guanosintrifosfát
G α_x	α podjednotka G-proteinu, kde x = typ
HEK293	lidská embryonální buňka ledvin 293
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
CHO	buňky z vaječníku čínského křečka
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthin
IP3	inositol-1,4,5-trifosfát

KOR	kappa (κ) opioidní receptor
l_d	fáze plazmatické membrány - kapalná neuspořádaná
LK	levá komora
l_o	fáze plazmatické membrány - kapalná uspořádaná
LTCC	L-tyt Ca^{2+} kanálu
M3G	morfin-3-glukuronid
M6G	morfin-6-glukuronid
MAPK	mitogeny aktivovaná proteinkináza
MOR	mí (μ) opioidní receptor
MR	muskarinový acetylcholinový receptor
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NOP-R	receptor nociceptinu
nor-BNI	norbinaltorfimin
OR	opioindní receptor
PC-12	buňky odvozené z feochromocytomu potkaní dřeně nadledvin
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PK	pyruvátkináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PLD2	fosfolipáza D2
PM	plazmatická membrána
PNS	postnukleární supernatant
PTX	toxin černého kašle
SCBt	Santa Cruz Biotechnology
SDS	dodecylsírán sodný
SK-N-BE	buňky lidského neuroblastomu
s_o	fáze plazmatické membrány - pevná uspořádaná
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tx	Triton X-100
U50488H	agonista KOR

1 Úvod

Morfin je opioidní agonista, který je užíván a zkoumán především pro své analgetické účinky, ale velká pozornost je v této souvislosti věnována také problematice vzniku tolerance a závislosti. Opioidní agonisté interagují s opioidními receptory a spolu tvoří opioidní systém. Ten se nalézá v mnoha tkáních včetně myokardu. Je známo, že opioidy společně s dalšími látkami ovlivňují základní srdeční funkce. V 90. letech minulého století byla zjištěna možnost určitého kardioprotektivního působení morfinu. Molekulární mechanismy účinku morfinu na myokard však nejsou dosud zdaleka prozkoumány.

Lipidové rafty bohaté na sfingolipidy a cholesterol jsou zapojeny do regulace mnohých buněčných funkcí, jako jsou transportní procesy, homeostáza cholesterolu, intracelulární třídění proteinů a lipidů, a především signalizace. Je známo, že tyto membránové mikrodomény obsahují i některé receptory spřažené s G-proteiny, kam patří i opioidní receptory. V lipidových raftech byly nalezeny také podjednotky G-proteinů, některé izoformy adenylátcyklázy a další důležité signální molekuly.

Cílem této práce bylo sledovat vliv morfinu na případnou změnu distribuce signálních molekul opioidního systému myokardu potkana v lipidových raftech. Tento výzkum může pomoci rozšířit poznatky týkající se molekulárních a buněčných mechanismů působení morfinu na myokard.

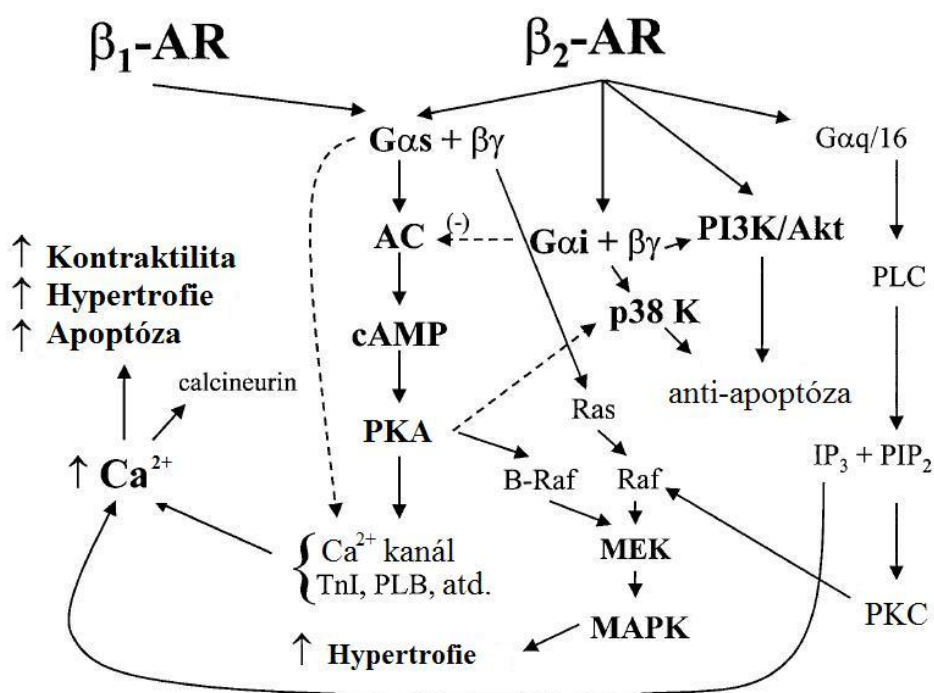
2 Literární přehled

2.1 Modulace srdeční činnosti

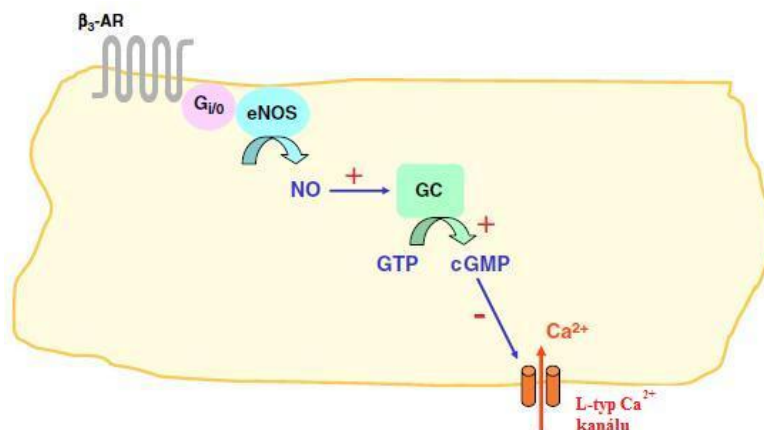
Srdeční činnost je řízena autonomním (vegetativním) nervovým systémem. Vegetativní systém je tvořen senzoryckými a motorickými neurony, které tvoří reflexní oblouk. Neurony zasahují do části mozkového kmene - prodloužené míchy, z které pak vedou k orgánům, které modulují. Motoneurony v periferním nervovém systému tvoří ganglia. Činnost srdce modulují sympatická a parasympatická ganglia, která mají opačný efekt. Hlavním mediátorem sympatiku je adrenalin, který má excitační účinek. Primárním ligandem parasympatiku je acetylcholin, který naopak vykazuje inhibiční charakter. Ligandy uvolněné z presynaptické části nervosvalového spojení se na postsynaptickém elementu vážou především na receptory spřažené s G-proteinem - GPCR. Jde především o adrenergní receptory a receptory acetylcholinové muskarinového typu. Srdeční činnost regulují i další složky jako jsou např. systémy histaminové, adenosinové, serotoninové, opioidní, angiotensinu II atd.

Adrenergní receptory se dělí na dvě skupiny: α -adrenergní a β -adrenergní receptory (α -AR a β -AR) (Brodde et al., 2006). Jsou známy tři typy α_1 -AR, tři α_2 -AR a tři β -AR. Všechny tyto receptory patří do rodiny GPCR, ale liší se svojí funkcí a mechanismem modulace, dále pak také distribucí v tkáních a primární strukturou.

V kardiomyocytech jsou nejvíce zastoupeny β_1 -AR (Brodde and Michel, 1999). Spolu s β_2 -AR se vážou na stimulační G-protein ($G\alpha_s$), který spouští signalizační kaskádu vedoucí k pozitivnímu inotropnímu a chronotropnímu efektu. β_2 -AR se také spřahují s inhibičními G-proteiny ($G\alpha_{i/o}$), což může vést k opačnému účinku (Kuschel et al., 1999). Signalizace zprostředkovaná těmito receptory může hrát roli v regulaci apoptózy, přičemž aktivace β_1 -AR má proapoptický charakter a aktivace β_2 -AR může být anti-apoptická (obr. 1) (Communal et al., 1999). Signalizace β_3 -AR ovlivňuje přes $G\alpha_{i/o}$ syntézu oxidu dusného (NO), což vyvolává negativní inotropii (obr. 2) (Gauthier et al., 1998).



Obr. 1: Schéma signalizace β_1 -AR a β_2 -AR. β_1 -AR = β -adrenergní receptor typu 1, β_2 -AR = β -adrenergní receptor typu 2, $G\alpha_s$ = stimulační α podjednotka G-proteinu, $\beta\gamma$ = komplex $\beta\gamma$ podjednotek G-proteinu, AC = adenylátcykláza, $cAMP$ = cyklický adenosintrifosfát, PKA = proteinkináza A, TnI = troponin I; PLB = fosfolipáza B, Raf = proto-onkogen serin/treoninových proteinkináz, MEK = mitogeny aktivovaná proteinkináza kináz, $MAPK$ = mitogeny aktivovaná proteinkináza, $G\alpha_i$ = inhibiční α podjednotka G-proteinu, $p38 K$ = p38 mitogeny aktivovaná proteinkináza, $PI3K/Akt$ = kináza fosfatidylinositolu 3/serin/treoninová proteinkináza; $G\alpha_q/16$ = α podjednotky G-proteinu typu q/16, PLC = fosfolipáza C, IP_3 = inositol-1,4,5-trisfosfát, PIP_2 = fosfoinositol-4,5-bisfosfát, PKC = proteinkináza C. Upraveno podle (Port and Bristow, 2001).



Obr. 2: Signalizace β_3 -AR v kardiomyocytech. β_3 -AR = β -adrenergní receptor typu 3; $G_{i/o}$ = inhibiční α podjednotky G-proteinu, eNOS = endoteliální syntáza NO, NO = oxid dusnatý, GC = guanylátcykláza, GTP = guanosintrifosfát; cGMP = cyklický guanosinmonofosfát, + = stimulace, - = inhibice. Upraveno podle (Rozec and Gauthier, 2006).

α -AR je známo více druhů (Brodde and Michel, 1999). Každý typ má další tři podtypy. Společným znakem α_1 -AR je jejich signalizace přes G_{α_q} , po které dochází k většímu uvolňování Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula do cytosolu buňky. Předpokládá se, že tato signalizace může způsobovat hypertrofii kardiomyocytů (Luo et al., 2006). Kromě fosfoinositol/ Ca^{2+} dráhy α_1 -AR ještě mohou inhibovat AC/cAMP signální dráhu přes G_{α_i} . O α_1 -AR se např. ví, že při srdeční nedostatečnosti mohou nahradit funkci hlavních β -AR (Skomedal et al., 1997). α_2 -AR na srdci nebyly dosud příliš dobře charakterizovány. Známa je jejich regulační funkce na presynaptické membráně (Rump et al., 1995).

Acetylcholin na srdci působí přes acetylcholinové receptory muskarinového typu. Dělí se do pěti skupin: M_1R - M_5R (Brodde and Michel, 1999). Nejlépe prozkoumány jsou M_2R , kterých je na kardiomyocyty nejvíce. Jejich signalizace tkví v interakci s $G_{\alpha_{i/o}}$, tudíž stimulace tohoto typu receptoru vede k negativnímu inotropnímu a chronotropnímu efektu.

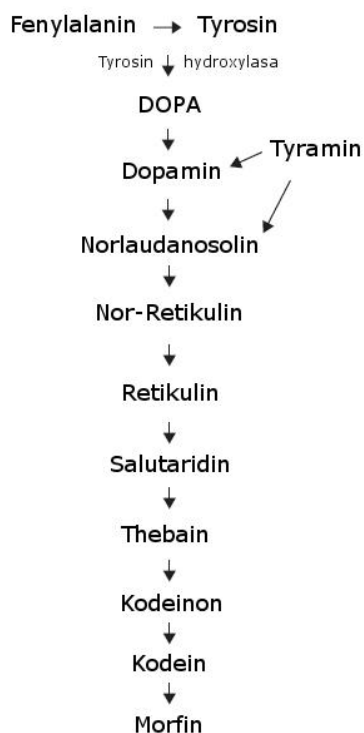
2.2 Morfin

Morfin patří mezi agonisty opioidních receptorů (OR). Byl objeven ke konci 19. století a posléze byly zjištěny jeho analgetické účinky, díky kterým je tento agonista stále nejčastěji užívaným analgetikem v lékařské praxi. Používání této látky však může

přinášet jak pozitivní tak i negativní efekty, které závisí především na velikosti podávaných dávek a délce jejich aplikace. Nepříjemným faktorem komplikujícím užívání morfinu je možný vznik tolerance a závislosti (Stefano et al., 2000). Rozvoj tolerance a závislosti souvisí s adaptivními změnami na úrovni receptorů a jejich signálních systémů. V roce 1996 bylo zjištěno určité kardioprotektivní působení morfinu (Barrère-Lemaire et al., 2005). Příslušné molekulární mechanismy ale nejsou dosud dobře prozkoumány.

Exogenně podaný morfin je metabolizován v játrech enzymem z rodiny UDP-glukuronosyltransferáz (UGT) na dva metabolity: morfin-3-glukuronid (M3G, 90 %) a morfin-6-glukuronid (M6G, 10 %) (Kilpatrick and Smith, 2005). M3G je metabolicky inaktivní, zatímco M6G má vyšší analgetické účinky než morfin s nižším počtem vedlejších účinků.

Dnes je známo, že se v těle savců nalézá i endogenní morfin, který se vyrábí *de novo* (Goldstein et al., 1985). Celou syntézu této molekuly je vidět na obr. 3. Klíčovou roli má v této syntéze dopamin (Neri et al., 2008).



Obr. 3: Schéma syntézy morfinu *de novo*

Morfin interaguje se všemi typy OR, přičemž nejvyšší afinitu má k MOR, který nese název právě po morfinu.

Dlouhodobé podávání morfinu vede ke vzniku tolerance a závislosti. Morfin je zajímavá látka i z hlediska výzkumu procesu desenzitizace, internalizace a down-regulace opioidních receptorů (viz níže) (Koch and Höllt, 2008).

2.3 Lipidové rafty

Plazmatická membrána (PM) eukaryotické buňky se skládá z lipidů, cholesterolu a membránových proteinů (Sonnino and Prinetti, 2013). Z lipidů jsou to především glycerolfosfolipidy a sfingolipidy, které spolu s cholesterolem mají amfipatický charakter. Tyto látky tvoří dvojvrstvu s polárními hlavičkami směřující ven od sebe a nepolárními částmi dovnitř k sobě. Cholesterol má především vyztužovací a ztlušující funkci, kterými potencuje tzv. „mismatch systém“. Membránové proteiny mohou být dvojího typu: transmembránové a periferní.

K charakterizaci PM se nejčastěji používá „model fluidní mozaiky“, který mj. poukazuje nato, že membrána není statická struktura, ale naopak velice dynamická, měnící se v čase a prostoru (Sonnino and Prinetti, 2013). Na základě složení lze lipidovou dvojvrstvu rozdělit do tří hlavních fyzikálních stavů (fází): pevná-uspořádaná (s_o), kapalná-neuspořádaná (l_d) a kapalná-uspořádaná (l_o) (Brown and London, 1998). Fáze s_o je charakterizována jako nepohyblivá, obsahující fosfolipidy s dlouhými saturevanými acylovými řetězci, které mají bod tání nad fyziologickou teplotou. Pokud je membrána bohatá na polynenasycené mastné kyseliny, lze ji zařadit do fáze l_d . Zajímavá je fáze l_o . Tato takřka střední fáze je pozorována ve směsích obsahující nasycené řetězce fosfolipidů (sfingolipidů) a cholesterol. Mikrodomény fáze l_o lze považovat za lipidové rafty.

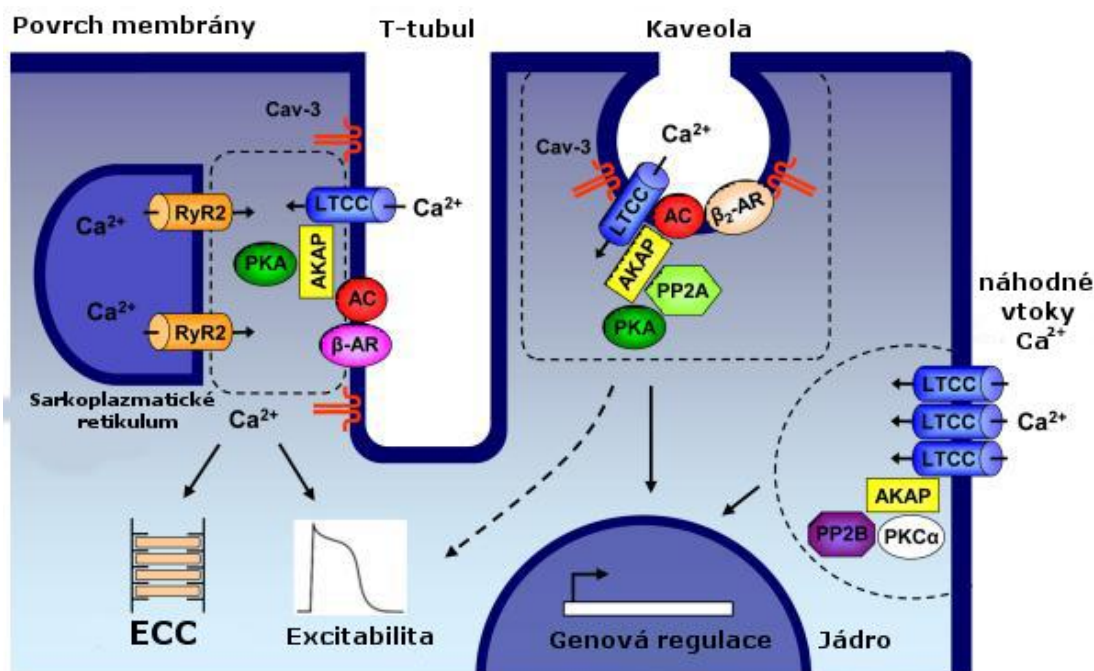
Lipidové rafty jsou s ohledem na svou velikost (5-200 nm) obtížně zkoumatelné útvary. Nejlépe dostupná metoda *in vitro* je založena na faktu, že lipidové mikrodomény odpovídají části membrány, která je působením neiontových detergentů (Triton X-100) při nízkých teplotách (4°C) resistantní vůči solubilizaci, čímž vzniká detergent-rezistentní membrána (DRM) (Shogomori and Brown, 2003). Dalším výzkumem byly nalezeny dvě populace lipidových raftů: kaveolární a non-kaveolární domény.

Kaveoly jsou specializované invaginované útvary na membráně, bohaté na cholesterol a integrační membránový protein kaveolin, jehož funkce je stále předmětem výzkumu. Kaveolin je kódován třemi geny (*CAVI-3*) (Scherer et al., 1995, 1996; Tang et al., 1996). Rozdíly lze nalézt především v jejich tkáňové distribuci, kde kaveolin 1 a 2 je exprimován téměř ve všech typech buněk, zatímco kaveolin 3 je, kromě několika typů neuronů, přítomen hlavně ve svalech.

Non-kaveolární rafty jsou ploché mikrodomény PM, které obsahují zvýšený počet monosialo-gangliosidu typu 3 (GM3) a za jeden z markerů je považován flotilin (Zhao et al., 2011). Flotilin je popisován jako lešeňovitý protein, u kterého ale zatím není známa funkce. Dělí se na dvě skupiny: flotilin 1 a flotilin 2. Zajímavostí je, že byl tento protein nalezen ve zvýšené míře při regenerace axonu gangliových buněk retiny. Pro tuto funkci byl nazván reggies.

Celkem vzato, lipidové domény lze považovat za platformy pro membránovou organizaci určitých signalizačních proteinů (Staubach and Hanisch, 2011). Jejich struktura napomáhá těsnějšímu spojení mezi sebou, kde vznikají lipid-lipid a lipid-proteinové interakce za tvorby komplexů. Komplexy proteinů přenos signálu urychlují a amplifikují, a přenos signálu může být přesněji regulován. Proteiny v raftech jsou nejčastěji kotvené GPI. Postranlačními modifikacemi mohou být některé proteiny palmitoylovány nebo myristoylovány, což také napomáhá k jejich integraci do mikrodomén (Resh, 2004). Kromě signalizační funkce a určitého řazení proteinů, lipidové mikrodomény zastávají i další buněčné funkce jako je membránový transport nebo distribuce cholesterolu (Chini and Parenti, 2004).

Dnes je známo, že v kaveolárních raftech se nalézají i některé GPCR, G-proteiny i efekторы regulované GPCR. U kardiomyocytů tomu není jinak. Prozkoumána je především lokalizace β -AR a jejich AC/cAMP signální dráhy v kaveolách (Ostrom et al., 2000). Tato lokalizace může být zajímavá i z pohledu opioidních receptorů jako modulátorů funkce β -AR, popř. heterodimerizace receptorů. V kaveolách kardiomyocytů se také nacházejí důležité iontové kanály a výměníky (Balijepalli and Kamp, 2008). Nejdůležitějším je L-typ Ca^{2+} kanálu (LTCC). Strukturní představa LTCC v kaveolách a mimo ně je zobrazena na obr. 4. Dále to jsou napěťově-závislé Na^+ kanály typu 1.5, pacemakerový K^+ kanál aktivovaný hyperpolarizací a cyklickými nukleotidy typu 4 a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměník.



Obr. 4: Schéma zobrazující výskyt L-typu Ca^{2+} kanálu v lipidových raftech kardiomyocytů spolu s asociovanými makromolekulárními signalizačními komplexy. Cav-3 = kaveolin 3, LTCC = L-typ Ca^{2+} kanálu, AC = adenylátcykláza, AKAP = protein kotvící se na A-kinázu, PKA = proteinkináza A, β -AR = beta adrenergní receptor, PKC α = proteinkináza C alfa, PP2A = protein fosfatáza 2A, PP2B = protein fosfatáza 2B, RyR2 = ryanodinový receptor, ECC = spřažení excitace s kontrakcí. Upraveno podle (Best and Kamp, 2012).

2.4 Opioidní receptory

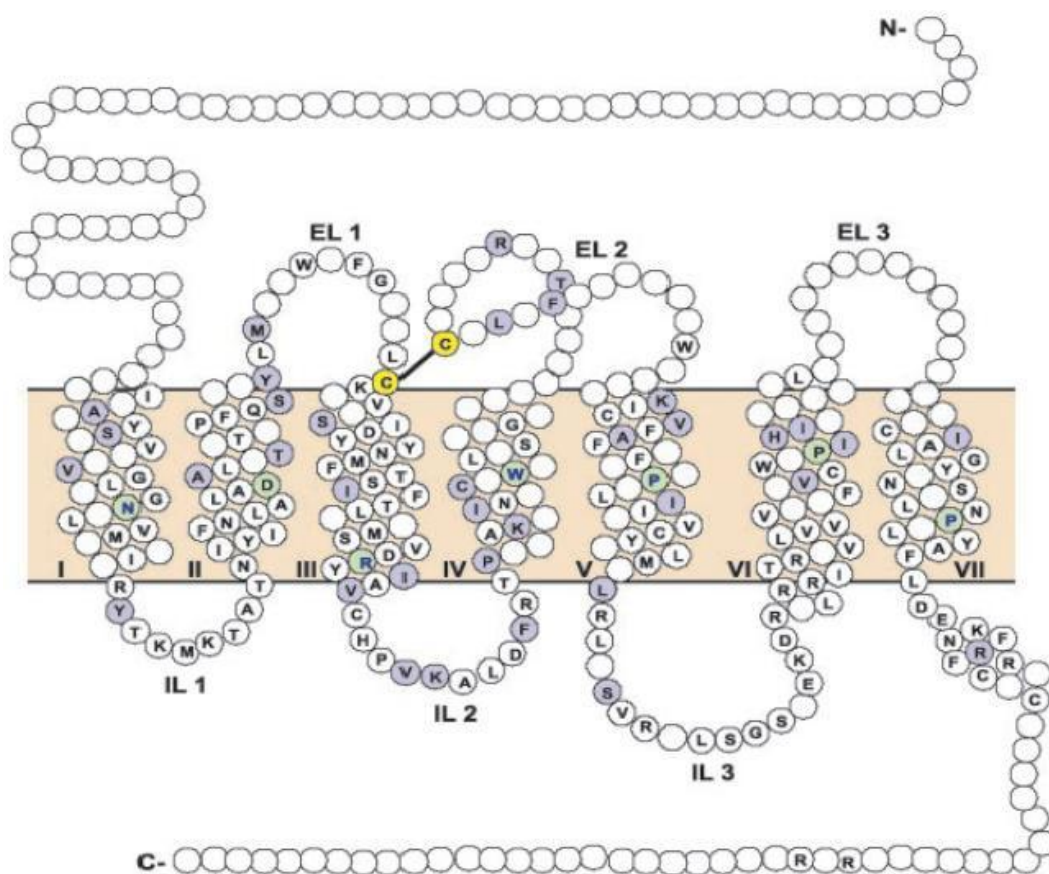
Opioidní receptory (OR) spolu s opioidními ligandy endogenního i exogenního původu tvoří opioidní systém. Tento systém hraje důležitou roli v mnoha centrálních i periferních oblastech organismu. Moduluje např. imunitní, gastrointestinální a srdeční funkce, ale i termoregulaci nebo respiraci. OR patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny, tzv. GPCR.

2.4.1 Rozdělení, zařazení a struktura

OR se dělí na čtyři typy. κ -OR (KOR, pojmenován podle ketocyklazocinu), δ -OR (DOR, pojmenován podle chámovodu - angl. deferens), a μ -OR (MOR, pojmenován podle morfinu) patří mezi tzv. klasické OR (Lord et al., 1977). Poslední skupinou jsou NOP-R, dříve známé jako ORL-1 nebo nociceptin/orphanin FQ receptory (Meunier et al., 1995). Tyto typy OR byly úspěšně naklonovány (Mollereau et al., 1994; Satoh and Minami, 1995). Jsou známy i další, méně charakterizované OR, jako např. ϵ -receptor a λ -receptor (Waldhoer et al., 2004).

Na základě farmakologických studií byly zjištěny i některé fenotypové rozdíly jednotlivých typů OR. Byly proto zařazeny do několika podtypů. Není však jisté, zda tyto rozdíly jsou následkem alternativního sestřihu mRNA, posttranslační modifikací, popř. dimerizací receptorů (Sato and Minami, 1995; Levac et al., 2002).

Jak už bylo řečeno, OR patří do skupiny GPCR. Je to velké rodina receptorů charakteristická svou strukturou. OR jsou řazeny do třídy A, která je také někdy nazývána třída receptoru rodopsinu podobná (Joost and Methner, 2002). Protein protíná membránu sedmi α -šroubovicovými doménami (obr. 5) (Waldhoer et al., 2004). Ty jsou spojeny smyčkami (tři intracelulární a tři extracelulární). Dále obsahuje extracelulární N-konec a intracelulární C-konec. Mezi první a druhou extracelulární smyčkou se nalézá disulfidický můstek. Celá struktura v membráně tvoří těsný šroubovicový celek receptoru. Jednotlivé typy OR, pokud budeme brát ty klasické, jsou totožné z 60% (Chen et al., 1993). Nejvíce identické jsou v oblasti transmembránové, oproti tomu nejméně na C- a N-konci (tab. 1).



Obr. 5: Struktura opioidních receptorů. Římské číslice značí číslo transmembránového úseku. Bíle značená kolečka značí aminokyseliny, které jednotlivé typy OR nemají společné. Bílá kolečka s písmenky značí aminokyseliny, které mají všechny čtyři OR stejné. Fialově značená kolečka značí podobnost aminokyselin mezi KOR, DOR a MOR. Žlutě je vyznačen cysteinový disulfidický můstek. IL 1-3 = intracelulární smyčka 1-3, EL 1-3 = extracelulární smyčka 1-3. (Waldhoer et al., 2004)

Tab. 1: Podobnost aminokyselinové sekvence mezi jednotlivými typy OR.

Strukturní oblast	Podobnost aminokyselin	
	KOR/MOR	KOR/DOR
<u>Extracelulární oblast</u>		
N-konec	6/63 (10 %)	5/53 (9 %)
První smyčka	12/18 (67 %)	13/18 (72 %)
Druhá smyčka	12/28 (43 %)	11/28 (39 %)
Třetí smyčka	5/14 (36 %)	2/14 (14 %)
<u>Transmembránové domény</u>		
TM1	14/22 (64 %)	13/22 (59 %)
TM2	19/22 (86 %)	19/22 (86 %)
TM3	20/22 (91 %)	20/22 (91 %)
TM4	7/22 (32 %)	12/22 (55 %)
TM5	16/22 (73 %)	16/22 (73 %)
TM6	16/22 (73 %)	14/22 (64 %)
TM7	19/22 (86 %)	18/22 (82 %)
<u>Intracelulární oblast</u>		
První smyčka	7/7 (100 %)	6/7 (86 %)
Druhá smyčka	20/22 (91 %)	21/22 (95 %)
Třetí smyčka	21/24 (88 %)	20/24 (83 %)
C-konec (před palmitoylací)	11/12 (92 %)	11/12 (92 %)
C-konec (po palmitoylací)	7/35 (20 %)	5/35 (14 %)

Upraveno podle (Chen et al., 1993).

Kromě rozdílů v některých částech struktury se typy OR liší v afinitě k ligandům, distribuci v tkáních a také určitými rozdíly v signalizaci. Tyto odlišnosti mohou být spjaty s jejich strukturou. Každý typ OR má svůj protějšek ve skupině opioidních peptidů, které se tvoří z prekurzorů (Raynor et al., 1994). Pro-opiomelanokortin je prekurzorem pro endorfiny. Tito agonisté mají podobnou afinitu k MOR a DOR, podstatně nižší mají pro KOR. Enkefaliny, jejichž prekurzorem je proenkefalin, lépe interagují s MOR, méně s DOR a nízkou afinitu mají pro KOR. Dalším prekurzorem je prodynorfin. Z něho se tvoří dynorfiny, které interagují s nejvyšší afinitou k KOR, méně k MOR a velice slabě k DOR. K interakci ligandu s receptorem přispívají jak extracelulární smyčky a N-konec tak i tvar šroubovicového celku a disulfidický můstek (Waldhoer et al., 2004).

Intracelulární části jednotlivých typů OR si jsou dosti podobné (tab. 1) (Chen et al., 1993). Tento fakt se odráží v možnosti interagovat s podobnými typy G-proteinů, z čehož vyplývá, že mohou ovlivňovat podobné signální dráhy (viz níže). Pro interakci G-proteinu slouží IL 2 a 3 spolu s C-terminální částí proteinu (Gether, 2000).

Co se týče distribuce v tkáních, tak ta je závislá na sledovaném druhu. U potkana můžeme nalézt všechny typy OR např. v mozku, ledvinách, děloze, vaječníku,

varlatech, plicích atd. (Wittert et al., 1996). Zato v žaludku byly nalezeny pouze DOR a KOR, a v játrech byly popsány pouze MOR a DOR.

2.4.2 OR v myokardu

Přítomnost opioidního systému v myokardu je známa. Má pozorovatelný účinek na srdeční činnost. Důkaz poskytl test, při kterém byl podán nespecifický antagonist OR - naloxon (Ela et al., 1993). Důsledkem podání této látky byla zvýšená kontraktilita, s tím spjatá zvýšená koncentrace Ca^{2+} v cytosolu a alkalóza. Méně prozkoumán je význam nebo ovlivnění opioidního systému při onemocnění srdce, popř. stresu.

Po narození myokard obsahuje MOR ve vyšší míře než DOR, ale v průběhu ontogeneze MOR téměř vymizí, přičemž u DOR dochází k malému navýšení počtu (Zimlichman et al., 1996). KOR na dospívajícím srdci převládají. Na srdeční tkáni dospělého jedince se dlouho tradovalo, že se MOR nenalézají. Novější studie s citlivějšími metodami však toto tvrzení vyvrátily (Head et al., 2005). Dnes je tedy známo, že se na vyvinutém srdci nalézají všechny typy OR. Nejvíce jsou zastoupeny KOR, v mnohem menší míře DOR a zanedbatelně MOR.

2.4.3 Signalizace

OR jako všechny receptory ze skupiny GPCR, vede informaci prostřednictvím navázaných G-proteinů. Tento způsob je majoritní, ale jsou známy i situace, kdy je informace vedena bez účasti G-proteinu, jako např. inhibice T-typu Ca^{2+} kanálu nociceptinem (Abdulla and Smith, 1997).

G-protein vázající se na receptor je heterotrimerní, skládá se tedy ze tří podjednotek - α , β a γ (Morris and Malbon, 1999). Je to enzym patřící do nadrodiny GTPáz, katalyzující hydrolýzu GTP na GDP. Aktivita enzymu náleží α podjednotce a hraje roli v aktivaci/inaktivaci signální transdukce. Signalizace probíhá několika za sebou jdoucími kroky, které se odehrávají po navázání ligandu na receptor (Morris and Malbon, 1999). Nejdříve dojde k disociaci GDP na α podjednotce, která v tuto chvíli tvoří trimer s komplexem $\beta\gamma$. Navázáním GTP na místo GDP dochází k aktivaci, která je následována disociací G-proteinu od receptoru a rozpadnutím trimerního komplexu na samostatnou α podjednotku a komplex $\beta\gamma$. Tyto struktury poté modulují aktivitu mnoha různých efektorů.

Existuje několik druhů od každé podjednotky G-proteinu, které se liší strukturou a vlastnostmi (Standifer and Pasternak, 1997). Klasické třídění je podle α podjednotky, které se dělí podle efektorů, které ovlivňují, a také podle citlivosti k některým toxinům, jako je toxin černého kašle (pertusis toxin - PTX) nebo toxin cholery. Seznam podjednotek G-proteinů a některé vlastnosti lze nalézt v tab. 2.

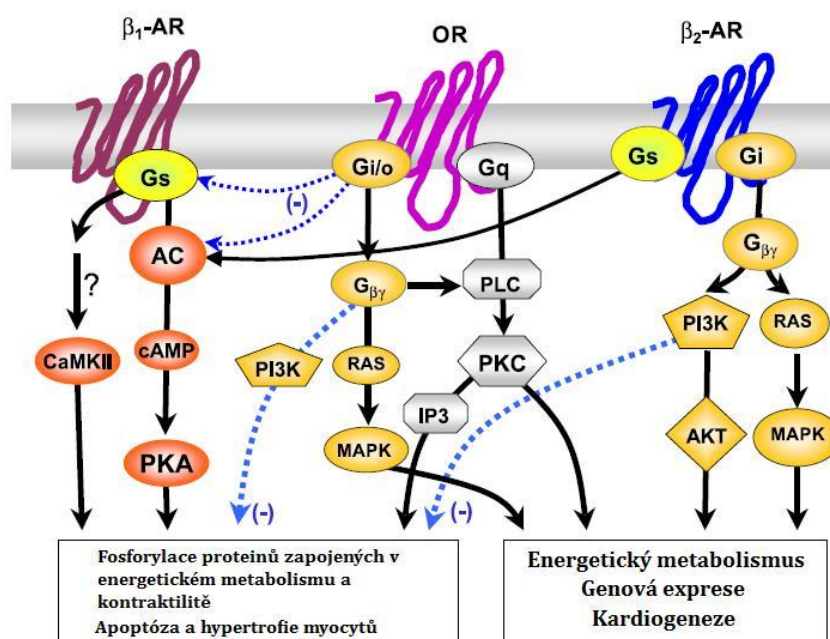
Tab. 2: Seznam podjednotek G-proteinu

Podjednotka	Preferovaná tkáň	Senzitivita k toxinům	Funkce
<u>Třída α_s</u>			
α_s	všudypřítomný	cholera	stimulace AC, regulace Ca^{2+} a K^+ kanálů
α_{olf}	čichový epitel	cholera	stimulace AC
<u>Třída α_i</u>			
$\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \alpha_{i3}$	všudypřítomný	PTX	inhibice AC, regulace K^+ kanálu
α_{o1}, α_{o2}	neurony	PTX	inhibice AC, regulace Ca^{2+} kanálu, modulace PLC β
α_{gust}	chuťové buňky	PTX	aktivace fosfodiesteráz, inhibice AC
$\alpha_{\text{t-tyčinky}}, \alpha_{\text{t-čípky}}$	fotoreceptory, chuťové buňky	PTX	aktivace cGMP fosfodiesteráz
α_z ($\alpha_x, \alpha_{x/z}$)	neurony	PTX	inhibice AC
<u>Třída α_q</u>			
α_q, α_{11}	všudypřítomný	-	aktivace PLC β
α_{14}	stromální a epiteální buňky	-	aktivace PLC β
α_{15}, α_{16}	hematopoetické buňky	-	aktivace PLC β
<u>Třída α_{12}</u>			
α_{12}, α_{13}	všudypřítomný	-	regulace Na^+/K^+ výměny
<u>Třída β</u>			
$\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5$	β_{1-3} - všudypřítomný, β_4 - všudypřítomný (vysoká koncentrace v mozku a plicích), β_5 - mozek	-	
<u>Třída γ</u>			
$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \gamma_5, \gamma_6, \gamma_7, \gamma_8, \gamma_9, \gamma_{10}, \gamma_{11}, \gamma_{12}$	γ_1 - tyčinky fotoreceptorů, γ_2, γ_7 - všudypřítomný, γ_3, γ_4 - mozek, γ_5, γ_{12} - všudypřítomný, γ_8 - čichová tkáň, čípky fotoreceptorů, γ_{11} - všudypřítomný (nízká koncentrace v mozku)	-	$\beta\gamma$ podjednotky selectivně ovlivňují: regulaci K^+ a Ca^{2+} kanálu, AC, PLC β , PLA $_2$, PI3K a kinázu β -AR

AC = adenylylácykláza, PTX = toxin černého kašle, PLC β = fosfolipáza C, cGMP = cyklický guanosinmonofosfát, PLA $_2$ = fosfolipáza A $_2$, PI3K = fosfatidylinositol-3-kináza. β -AR = β adrenergní receptor. Upraveno dle (Standifer and Pasternak, 1997).

Opioidní receptory se především spřahují s PTX citlivými inhibičními α podjednotkami G-proteinu ($G_{i/o}$) (Waldhoer et al., 2004). Méně častá, ale možná, je interakce s podjednotkami PTX necitlivými $G_{q/11}$ a G_{12} (Standifer et al., 1996; Sánchez-Blázquez et al., 1999). Dráhy, které se účastní přenosu signálu od aktivovaných receptorů, se liší cílovými efekty. Modulují např. aktivitu adenylátcyklázy (AC) (Yasuda et al., 1993), fosfolipázu C (PLC), L- a N-typ Ca^{2+} kanálu (Tallent et al., 1994; Piro et al., 1996), Na^+/H^+ pumpu (Bian et al., 2000), popř. dovnitř usměřující K^+ kanály (Kir, GIRK) (Henry et al., 1995).

Dráha vedená prostřednictvím inhibičních G-proteinů inhibuje aktivitu AC, což má za následek pokles koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a tedy snížení aktivity proteinkinázy A (PKA). Tuto dráhu lze vidět na obr. 6. Po navázání ligandu na receptory spřažené s $G_{q/11}$ dochází k aktivaci PLC. Tím se docílí štěpení fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu (PIP₂) v plazmatické membráně za tvorby diacylglycerolu (DG) a inositol-1,4,5-trisfosfátu (IP₃). DG účinkuje jako aktivátor proteinkinázy C (PKC) a IP₃ reguluje otvírání kanálů v zásobnících Ca^{2+} (sarkoplasmatické retikulum). Už delší dobu je známo, že aktivitu různých efektorů (např. AC nebo PLC), ne nutně těch samých jako α podjednotka, moduluje i komplex $\beta\gamma$. Za určitých okolností může dojít k aktivaci některých izoform AC i působením komplexu $\beta\gamma$ uvolněného z inhibičního $G_{i/o}$ proteinu.



Obr. 6: Signalizace OR, β -AR, a jejich vzájemné ovlivnění. Gs = stimulační α podjednotka G proteinu, CaMKII = proteinkináza závislá na kalmodulinu typu 2, AC = adenylátcykláza, cAMP = cyklický adenosintrifosfát, PKA = proteinkináza A, PLC = fosfolipáza C, Gi/o = inhibiční α podjednotky G-proteinu, $\beta\gamma$ = komplex $\beta\gamma$ podjednotek G-proteinu, PI3K = kináza fosfatidylinositolu 3, MAPK = mitogeny aktivovaná proteinkináza, Gq = α podjednotka G-proteinu typu Q, PLC = fosfolipáza C, PKC = proteinkináza C, IP3 = inositol-1,4,5-trisfosfát, PIP2: fosfoinositol-4,5-bisfosfát, PKC = proteinkináza C, Akt = serin/treoninová proteinkináza. Upraveno podle (Pepe et al., 1997).

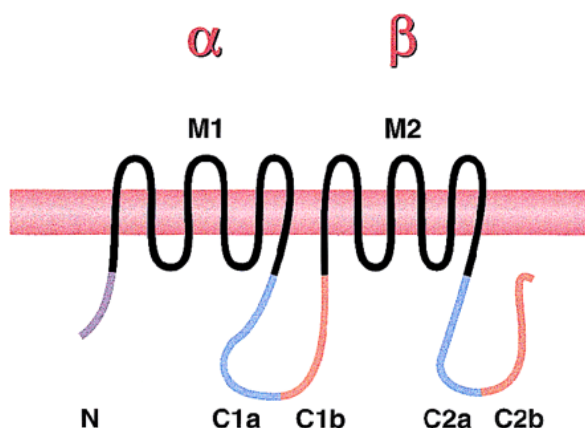
Těmito drahami OR modulují velké množství buněčných komponent, kam lze zařadit iontové kanály a pumpy, zodpovědné za excitabilitu jednotlivých buněk popř. kontrakci svaloviny. Tyto komponenty se často skládají z podjednotek, kterých je velké množství, a kde panuje vysoká variabilita. Spolu s různými typy podjednotek G-proteinu může receptor ovlivnit i jiné kanály s odlišnou modulační silou, hovoří se o vysoké plasticitě. Tak například DOR a MOR prostřednictvím $G_{i/o}$ inhibují L-typy Ca^{2+} kanálu (Piros et al., 1996). KOR i MOR inhibují N-, P- a Q-typy Ca^{2+} kanálů a to prostřednictvím komplexu $\beta\gamma$ a ne inhibičními α podjednotkami, jak se dříve předpokládalo (Minoia and Sciorsci, 2001).

2.4.4 Adenylátcykláza

Jedním z nejdůležitějších efektorů ovlivňovaných mnoha GPCR a tedy i opioidním systémem je adenylátcykláza (AC). AC je enzym vázaný v plazmatické membráně,

který katalyzuje syntézu 3',5'-cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) z adenosintrifosfátu (ATP) (Ishikawa and Homcy, 1997). Ten jako druhý posel ovlivňuje řadu buněčných komponent a procesů. Především je to cAMP-dependentní kináza neboli proteinkináza A (PKA), o které se ví již mnoho let (Kuo and Greengard, 1970). PKA fosforylací ovlivňuje funkci mnoha buněčných proteinů. Jako další typickou komponentu ovlivněnou cAMP lze uvést např. transkripční faktor CREB (Goldspink and Russell, 1994).

Struktura AC je spíše podobná nějakému iontovému kanálu či přenašeči (Ishikawa and Homcy, 1997). Skládá se ze dvou podjednotek α a β . Obě šestkrát protínají plazmatickou membránu a jsou spojeny cytoplasmatickou smyčkou. N- i C- konec se nachází v intracelulární části (obr. 7). Smyčka a C- konec je dělena na katalytickou a nekatalytickou část. Zajímavé je, že enzym neobsahuje žádný motiv vázající ATP. Pro správnou katalytickou funkci je potřeba dosáhnout určité vzájemné konformace obou podjednotek.



Obr. 7: Struktura enzymu AC. N = N-konec, M1 = prvních šest transmembránových domén, C1a = první katalytická intracelulární doména, C1b = první intracelulární nekatalytická doména, M2 = druhých šest transmembránových domén, C2a = druhá katalytická intracelulární doména, C2b = druhá intracelulární nekatalytická doména. α označuje přední polovinu molekuly, β druhou zádni polovinu. (Ishikawa and Homcy, 1997)

Je známo devět izoforem (savčích), které se liší distribucí v tkáních, primární strukturou a citlivostí k aktivátorům (Ishikawa and Homcy, 1997). Jak už bylo řečeno výše, AC je inhibována α -podjednotkami inhibičních $G_{i/o}$ proteinů interagujících s OR. Bylo pozorováno, že aktivace OR může za určitých okolností vést i ke zvýšení aktivity AC, což je připisováno dvěma dalším podjednotkám G proteinu, β a γ , které tvoří heterodimerní komplexy (Standifer and Pasternak, 1997). Některé izoformy jsou aktivovány jinak prostřednictvím G-proteinů. Je to především působením iontů Ca^{2+} ,

popř. Ca^{2+} /kalmodulin dependentním systémem a některými proteinkinázami jako je PKA, PKC nebo CAMK (tab. 3).

Tab. 3: Specifická regulace AC závislá na jednotlivých izoformách

Regulátor	Efekt	Izoforma AC
<u>G protein</u>		
$G\alpha_s$	Stimulace	Všechny typy
$G\alpha_i$	Inhibice	AC I, AC V, AC VI
$G\beta\gamma$	Inhibice	AC I, AC V*, AC VI*
	Stimulace	AC II, AC IV, AC V*, AC VI*
<u>Forskolin</u>		
	Stimulace	Všechny typy
<u>Ca^{2+}/kalmodulin</u>		
Ca^{2+} /CaM	Stimulace	AC I, AC III, AC VIII
Ca^{2+}	Inhibice	AC V, AC VI
<u>Regulace kinázami</u>		
PKC	Stimulace	AC I, AC II, AC III, AC V, AC VII
	Inhibice	AC VI
PKA	Inhibice	AC V, AC VI
CaMK	Inhibice	AC I, AC III
RafK	Stimulace	AC II, AC V, AC VI

* = stimulace/inhibice AC V/VI závisí na podmínkách. Upraveno podle (Ostrom et al., 2012).

V kardiomyocytech jsou přítomny především izoformy AC V a VI (Ishikawa et al., 1992; Krupinski et al., 1992), jejichž aktivita je stimulována $G\alpha_s$ a inhibována $G\alpha_{i/o}$ a $G\beta\gamma$ (Ostrom et al., 2012). Inhibována je také ionty Ca^{2+} a PKA. Naopak stimulována je Raf kinázou. Opačný regulační efekt na tyto dvě izoformy AC má PKC. AC V je kinázou stimulována a AC VI naopak inhibována (tab. 3).

2.4.5 Signalizace a působení OR v myokardu

V odborné literatuře obecně není mnoho prací zabývajících se opioidním systémem a jeho signalizací v myokardu. Většina dosavadních prací byla zaměřena na zkoumání funkce OR za použití specifických agonistů. Je známo, že OR za normálních okolností podněcují v srdci negativní inotropní účinek (Ventura et al., 1992). Předpokládá se, že tento efekt OR je zprostředkován inhibicí aktivity AC, což vede ke snížení koncentrace intracelulárního cAMP. Některé studie byly zaměřeny také na sledování pohybu iontů po aktivaci OR v kardiocytech. Bylo zjištěno, že U50488H (specifický agonista KOR)

způsobuje zvýšení koncentrace Ca^{2+} v buňce (Bian et al., 2000). Tento ligand také ovlivňuje funkci Na^+/H^+ pumpy, což má za následek zvýšení koncentrace Na^+ v buňce. Zvýšené koncentrace těchto iontů mohou vést ke vzniku nežádoucích srdečních arytmií. Tento stav lze blokovat pertusis toxinem (PTX), selektivními antagonisty KOR (např. nor-BNI) nebo inhibicí fosfolipázy C (Bian et al., 2000). V potkaních kardiomyocytech byl také popsán vliv fosfoinositol/ Ca^{2+} signální dráhy na AC/cAMP signální dráhu (Zhang and Wong, 1998). Po aktivaci KOR působením U50488H byla zjištěna zvýšená intracelulární koncentrace Ca^{2+} , která vedla k potlačení forskolinem indukované akumulace cAMP. Tento efekt je dán přítomností dvou dominantních izoform AC (V a VI), jejichž aktivita je inhibována Ca^{2+} ionty. Pomocí specifických agonistů byla zkoumána také úloha DOR v myokardu a ukázalo se, že stimulace tohoto receptoru leu-enkefalinem vede k redukci Ca^{2+} transientních odpovědí (Pepe et al., 1997). Kromě toho bylo již dříve pozorováno, že DALA (agonista DOR) v kardiomyocytech komor kuřecích embryí zvyšuje vtok Ca^{2+} do buňky přes vápníkové kanály závislé na napětí (Laurent et al., 1986). Dalším zajímavým zjištěním této práce byl stimulační účinek tohoto agonisty na aktivitu AC. Tyto rozporné výsledky (různé ovlivnění aktivity AC působením Ca^{2+} při aktivaci OR) poukazují na zřejmě odlišné mechanismy regulace této signalizace u různých živočišných druhů nebo případně mohou souviset se změnami v průběhu kardiogeneze. Bližší údaje k této problematice však zatím scházejí.

V předchozím desetiletí byl popsán potenciální význam opioidního systému v navození odolnosti k ischemii. Výsledky studií prováděných na lidech i zvířecích modelech odhalily, že aplikace naloxonu nebo naltrindolu (antagonisté OR) může potlačit rezistenční efekt v tkáních, který je vyvolán tzv. ischemickým preconditioningem (IPC) (Tomai et al., 1999; Huh et al., 2001). Bylo zjištěno, že OR zřejmě mohou být zapojeny v mechanismu IPC, který zmírňuje výskyt komorových arytmií a rozsah infarktu (Wang et al., 2001). V nedávných experimentech provedených na myším modelu bylo po kontinuální pětidenní aplikaci morfinu pozorováno vytvoření dlouhodobého kardioprotektivního fenotypu (Peart et al., 2011). Mechanismus, kterým opioidy tento efekt zprostředkovávají, však není zatím znám.

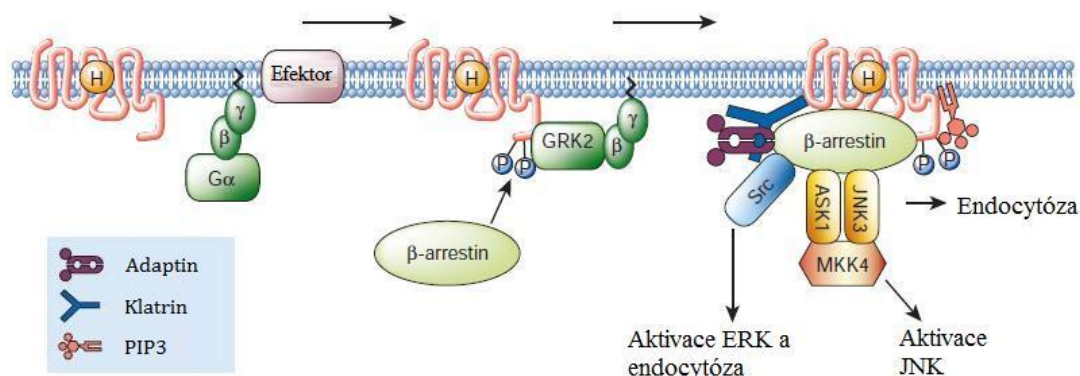
2.4.6 Desenzitizace, internalizace a downregulace

Možný vznik tolerance a fyzické závislosti jsou fenomény, které komplikují využívání opioidů v klinické praxi. Molekulární mechanismy těchto jevů však nejsou doposud zcela objasněny. Ze studií prováděných *in vivo* a *in vitro* byly

při dlouhodobější stimulaci OR agonisty pozorovány různé buněčné adaptace (Koch and Höllt, 2008). Podobně jako u jiných typů GPCR dochází při kontinuální stimulaci těchto receptorů k tzv. desenzitizaci, tedy ke ztrátě schopnosti přenášet signály do buňky. V řádu minut po stimulaci receptoru dochází k jeho internalizaci. Proces je ukončen buď navrácením receptoru zpět do membrány (resenzitizace) nebo jeho degradací (down-regulace). Vztah mezi down-regulací a desenzitizací nebyl nalezen. Bylo prokázáno, že down-regulace je vyvolána vyššími dávkami ligandu a delším expozičním časem než je tomu u desenzitizace (Puttfarcken and Cox, 1989). Proto se předpokládá, že tyto dva procesy jsou samostatné a na sobě nezávislé (Gomes et al., 2002). Regulace OR v srdci působením morfinu nebyla dosud sledována. Většina prací zabývajících se opioidními receptory byla zaměřena především na MOR v mozkové tkáni, kde se nachází mnohem více těchto receptorů než v myokardu.

V odborné literatuře se desenzitizace rozděluje na dva druhy (Bünemann et al., 1999). Prvním je homologní desenzitizace, ke které dochází vlivem dlouhodobého působení agonisty na receptor (obr. 8). Druhým pak heterologní desenzitizace. Ta se projevuje i v inaktivním stavu receptoru. Jak velkou měrou a jakým způsobem k desenzitizaci dojde, závisí na druhu agonisty, druhu receptoru a signalizaci, jakou zprostředkovává.

Podkladem desenzitizace je fosforylace a odpřažení receptoru od příslušného G-proteinu, přičemž důležitou roli v tomto procesu hraje β -arrestin (Bünemann et al., 1999). U každého druhu způsobuje fosforylaci jiná kináza. U homologní desenzitizace působí kináza GRK, tedy kináza vázající se na receptor spřažený s G-proteinem. Za fosforylaci receptoru u heterologní desenzitizace stojí PKA nebo PKC.



Obr. 8: Schéma naznačující kroky při homologní desenzitizaci receptorů. Šipky naznačují jednotlivé kroky. $G\alpha, \beta, \gamma$ = podjednotky G-proteinu, GRK2 = kináza receptorů spřažených s G-proteiny typ 2, Src = rodina non-receptorových tyrosin kináz, ERK = extracelulárně regulovaná kináza, ASK1 = apoptózou regulovaná kináza 1, JNK3 = c Jun kináza N-konce 3, MKK4 = mitogeny aktivovaná proteinkináza kináz 4, PIP3 = fosfatidylinositoltrifosfát. Upraveno podle (Rockman et al., 2002).

GRK se zapojují do desenzitizace OR, což bylo prokázáno na několika modelech. Příkladem mohou být buňky HEK293, kde zvýšením exprese GRK došlo ke zvýšení schopnosti morfinu fosforylovat MOR (Zhang et al., 1998). Dalším zkoumanými buňky byly buňky neuroblastomu SK-N-BE, kterým byl podán inhibitor GRK, v tomto případě heparin, a následně pozorován pokles desenzitizace DOR vyvolaný morfinem (Hasbi et al., 1998).

PKA, strukturně heterotetramer, je proteinkináza závislá na cAMP (Taylor et al., 2004). Aktivovaná je pouze po navázání cAMP na regulační části, kdy se uvolní část katalytická. Jelikož se opioidní receptory převážně spřahují s $G\alpha_{i/o}$, vliv tohoto enzymu na desenzitizaci se nepředpokládá. I když existují některé studie, které mírnou desenzitizaci OR tímto enzymem potvrzovaly, nakonec se ukázalo, že cAMP a na něm závislá kináza tuto desenzitizaci působením opioidních agonistů nezpůsobuje (Chakrabarti et al., 1998; Wang and Sadée, 2000).

Naproti tomu u PKC, další z rodiny serin/treoninových kináz, se vliv na desenzitizaci prokázal (Johnson et al., 2006). PKC lze dělit do tří skupin, které se liší primární strukturou N-terminální domény, kde se nachází vazebná místo pro modulátory - DAG nebo Ca^{2+} (Poole et al., 2004).

Existují ještě dvě skupiny kináz, které by mohly zasahovat do desenzitizace. Jsou to Ca^{2+} /kalmodulin dependentní proteinkinázy II (CAMKII) a mitogeny aktivované

proteinkinázy (MAPK). OR (resp. MOR) sice pro CAMKII obsahují fosforylační místo, ale dosud se nenalezl důkaz, který by fosforylaci touto kinázou potvrdil (Koch et al., 2000). U MAPK (ERK1/2) se nakonec ukázalo, že mají na fosforylaci receptoru pouze nepřímý vliv a to působením na jinou kinázu typu GRK (GRK2/3) (Thakker and Standifer, 2002). Tato studie byla prováděna na buňkách SH-SY5Y.

Internalizace je proces, kdy je receptor endocytován do buňky. Poté, co je receptor vlivem působení agonisty fosforylován, dojde ke změně konformace, která zvýší afinitu pro cytosolický β -arrestin, který následně s receptorem interaguje. Tento stav nejen zabráni jeho dalšímu kontaktu receptoru s G-proteiny, ale napomáhá také k rekrutování endocytického aparátu, který zprostředkuje následnou internalizaci receptoru cestou klatrinových váčků. Existují i jiné mechanismy, které používají jiný typ váčků (více informací v (Claing et al., 2002)). Z pohledu lipidových mikrodomén je podstatná kaveoly/rafty zprostředkovaná endocytóza.

Byly zjištěny rozdíly v internalizaci MOR při použití odlišných agonistů - morfinu a DAMGO (Keith et al., 1996; Koch et al., 2005; Johnson et al., 2006). Při použití DAMGO k internalizaci došlo, přičemž podání morfinu internalizaci receptorů nevyvolalo, a to ani při použití vysoké koncentrace. V těchto studiích prováděných na buňkách HEK293 se také ukázalo, že internalizace je důležitým procesem zabráňujícím dlouhodobé desenzitizaci. Agonisté s nižší účinností internalizace způsobují rychlejší desenzitizaci a naopak agonisté s vyšší účinností desenzitizují receptor pomaleji. Funkcí internalizace tedy není blokáce signálu, nýbrž schopnost receptor resenzitizovat. Jiná studie provedená na neuronech ale tento předpoklad nepotvrdila, protože byla pozorována internalizace vyvolaná morfinem v některých oblastech mozku, a to i ve stejné míře jako při použití agonisty DAMGO (Haberstock-Debic et al., 2005). Posunem bylo zjištění, že internalizaci vyvolanou morfinem potencuje zvýšená exprese GRK a β -arrestinu (Schulz et al., 2004). Závěrečným faktem, který vysvětluje tyto tkáňové a druhem agonisty závislé rozdíly, bylo nalezení funkce fosfolipázy D2 (PLD2) (Koch et al., 2006). Ta je aktivována jen po interakci některých agonistů s receptorem. Předpokládá se tedy souvislost internalizace s lokalizací a úrovní exprese PLD2.

Down-regulace nastává, pokud je receptor aktivován agonistou po delší dobu, např. při chronickém léčení opioidy. Dochází přitom ke snížení celkového počtu receptorů buď degradací internalizovaného receptoru, nebo snížením jeho exprese. Down-regulaci

může indukovat pouze plný agonista, parciální agonista nebo antagonist a tento efekt nezpůsobuje (Yabaluri and Medzihradsky, 1997).

Mezi výsledky testů *in vitro* a *in vivo* je rozdíl. U testů *in vitro* byla down-regulace jasně prokázána (Yabaluri and Medzihradsky, 1997), ale v *in vivo* studiích byly závěry rozdílné (Zadina et al., 1995). Docházelo ke snížení, navýšení a dokonce i k žádné změně v počtu receptorů. Výzkum byl prováděn u různých mozkových struktur za použití odlišných agonistů, z čehož se dá usuzovat, že down-regulace je proces specificky závislý na ligandu a struktuře. Příkladem může sloužit studie down-regulace MOR, kdy byly použity dva ligandy - morfin a etorfin (Patel et al., 2002). Zkoumáno bylo zastoupení GRK a dynaminu, což jsou enzymy zapojující se do internalizace a tedy i down-regulace. Etorfin zvýšil množství míšního dynaminu a naopak snížil úroveň mRNA. Na mRNA a proteinovou úroveň GRK neměl tento ligand vliv. Morfin neovlivnil ani jeden z těchto enzymů.

3 Cíle diplomové práce

Hlavní cíle diplomové práce byly:

1. Izolovat a charakterizovat lipidové rafty ze vzorků myokardu potkana pomocí různých detergentů (Triton X-100, CHAPS, cholát) nebo uhličitanu sodného
2. Sledovat vliv morfinu na zastoupení signálních molekul v lipidových mikrodoménách extrahovaných ze srdeční tkáně potkana různými detergenty nebo uhličitanem sodným
3. Stanovit aktivitu adenylátcyklázy v lipidových raftech.

4 Materiály a metody

4.1 Chemikálie

[³H]cyklický adenosinmonofosfát ([³H]cAMP) - American Radiolabeled Chemicals,
USA

[α-³²P]adenosintrifosfát ([α-³²P]ATP) - Izotop Hungary, Maďarsko

3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát (CHAPS) - Serva,
Německo

3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) - Sigma-Aldrich, USA

Akrylamid - Serva, Německo

Butanol - Lach-Ner, ČR

Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) - Sigma-Aldrich, USA

Dodecylsírán sodný - Serva, Německo

Glycin - Serva, Německo

Guanosintrifosfát (GTP) - Sigma-Aldrich, USA

Hovězí sérový albumin (BSA) - Sigma-Aldrich, USA

Hydroxid sodný - Lach-Ner, ČR

Chlorid sodný - Penta, ČR

Imidazol - Sigma-Aldrich, USA

Kyselina bichoninová - Sigma-Aldrich, USA

Kyselina chlorovodíková - Lach-Ner, ČR

Kyselina cholová - Sigma-Aldrich, USA

Methanol - Lach-Ner, ČR

Odtučněné mléko Laktino - PML Protein. Mléko. Laktóza, ČR

N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin(TEMED) - Serva, Německo

N,N'-metylenbisakrylamid - Serva, Německo

Oxid hlinitý 90 (aktivní, neutrální) - Merck, Německo

Pentahydrát chloridu hořečnatého - Serva, Německo

Pentahydrát síranu měďnatého - Lachema, ČR

Peroxodisírán amonný (APS) - Sigma-Aldrich, USA

Pyruvátkináza (PK) - Sigma-Aldrich, USA

Tris báze - Sigma-Aldrich, USA

Triton X-100 - Sigma-Aldrich, USA

Tween-20 - Sigma - Aldrich, USA

Uhličitan sodný - Lachema, ČR

Vínan sodný - Lachema, ČR

4.2 Roztoky

Pokud není uvedeno jinak, byly roztoky ředěny deionizovanou vodou připravenou z přístroje SCI-AQUA LAB (SISw, ČR) a připraveny postupy uvedenými u jednotlivých metod. pH bylo upravováno koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou, detekováno elektrodou InLab Basic (Mettler-Toledo, Švýcarsko) a měřeno na pH metru Orion PerpectLogR meter (ThermoScientific, USA).

4.3 Experimentální zvířata

K experimentu bylo použito pět skupin dospělých potkaních samců kmene Wistar. Zvířata byla chována po skupinách v oddělených klecích se stálým přístupem k vodě a potravě s pravidelným světelným režimem 12/12. Potkanům byl aplikován morfin intramuskulárně v dávkách 0,1 mg/kg/den, 1 mg/kg/den či 10 mg/kg/den po dobu 10 nebo 28 dní (dle tab. 4). Jako kontrolní vzorky sloužily tkáně z potkanů, jímž byl podáván po odpovídající dobu fyziologický roztok. Po aplikaci poslední dávky morfinu byla zvířata následující den usmrcena nebo v případě vysazení (regrese) s odstupem jednoho týdne. Po usmrcení bylo potkanům vyjmuto srdce a k dalším experimentům byly používány pouze levé komory.

Tab. 4: Schéma skupin potkanů s jejich základními charakteristikami

Skupina	Kontrola	M 0,1	M 1	M 1,R	M 10
Počet jedinců	13	14	14	14	19
Dávka morfinu (mg/kg/den)	-	0,1	1,0	1,0	10,0
Doba podávání (den)	28	28	28	28	10
Regrese (den)	-	-	-	7	-
Celková hmotnost LK (g)	7,0	7,4	7,7	8,0	6,5

M = morfin, LK = levá komora, R = regrese, čísla u skupin uvádějí podávanou dávku morfinu v jednotkách mg/kg/den

4.4 Homogenizace, frakcionace

Před dalšími experimenty bylo nutné zmraženou srdeční tkáň nejprve homogenizovat. Cílem bylo připravit postnukleární supernatant (PNS) vhodný pro další frakcionaci.

4.4.1 Roztoky

Pufr TMES (pH 7,4): 20mM Tris, 3mM MgCl₂, 1mM EDTA, 250mM sacharóza

Roztok inhibitoru proteáz Complete Protease Inhibitor Cocktail (50x koncentrovaný)

4.4.2 Pracovní postup

Levé komory jednotlivých experimentálních skupin byly zváženy a následně k nim byl přidán vychlazený pufr TMES (na 1g tkáně 4 ml pufru) a odpovídající množství inhibitoru proteáz Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Německo), aby se předešlo degradaci proteinů. Tkáň byla nejdříve nahrubo nastříhána a poté nadvakrát homogenizována. První homogenizace proběhla na přístroji Ultra-Turrax (IKA, Německo) při 24 000 rpm (z angl. revolutions per minute - otáčky za minutu) po dobu 15 vteřin. Druhá homogenizace byla provedena na Potter-Elvehjemově (P-E) sklo-teflonovém homogenizátoru Eurostar per-b (IKA, Německo) při 1 200 rpm opakovaným posunováním pístu (10x).

Takto zhomogenizovaná tkáň byla centrifugována při 2 100 rpm (600x g) při 4°C po dobu 10 minut bez brzdění na centrifuze Universal30RF (Hettich, Německo). Získaný supernatant byl odebrán a uchován na ledu. K peletě bylo přidáno TMES (na 1 g původní tkáně 4 ml pufru) a odpovídající množství inhibitoru proteáz (Complete Protease Inhibitor Cocktail). Resuspendovaná peleta po přidání pufru TMES (stejný objem jako při první homogenizaci) byla homogenizována pomocí P-E sklo-teflonového homogenizátoru Eurostar per-b (IKA, Německo) při 1 200 rpm opakovaným pohybem pístu (10x). Homogenát byl opět centrifugován při 2 100 rpm (600x g) při teplotě 4 °C a po dobu 10 minut bez brzdění na centrifuze Universal 30RF (Hettich, Německo). Druhý supernatant byl přidán k prvnímu. Spojená frakce obou supernatantů byla důkladně promíchána a uchována na ledu. Tato frakce odpovídala PNS.

4.5 Solubilizace a jednokroková izolace lipidových raftů (DRM)

K solubilizaci lipidových raftů (DRM) lze vybrat ze široké škály detergentů. Nejčastější způsob je prováděn neiontovým detergentem Tritonem X-100 při teplotě 4°C (Brown and Rose, 1992). Kromě detergentů lze použít i non-detergentní látky a při tomto postupu se využívá alkalický roztok uhličitanu sodného (Song et al., 1996).

Za účelem porovnání vlivu různých extrakčních činidel byla solubilizace v našich experimentech prováděna čtyřmi různými látkami. Solubilizace byla provedena třemi detergenty s výslednými koncentracemi: 1% (v/v) Tritonem X-100, 1% (w/v) CHAPS a 1% (w/v) cholátem sodným. Detergenty mají odlišné vlastnosti a předpokládá se různý poměr proteinů v doménách a mimo ně. Dále byl použit i non-detergentový způsob extrakce pomocí 1M uhličitanu sodného (pH 11).

V literatuře se uvádí, že k získání lipidových domén lze kromě flotace na sacharózovém gradientu použít jednokrokovou izolaci (Rubin and Ismail-Beigi, 2003). Aplikovali jsme tento postup v našem případě (ultracentrifugace při 128 000x g za teploty 4°C), přičemž vytvořená peleta obsahovala lipidové rafty (DRM) a v supernatantu se nalézaly solubilizované proteiny.

4.5.1 Roztoky

2 % (v/v) Triton X-100

2 % (w/v) CHAPS

2 % (w/v) cholát sodný

1 M uhličitan sodný

Pufr TME (pH 7,4): 20mMTris, 3mM MgCl₂, 1mM EDTA

4.5.2 Pracovní postup

Z PNS bylo odebráno 10 ml a tento objem byl rozdělen na frakce po 2,5 ml. Ke každé frakci byl přidán jeden ze solubilizačních roztoků v poměru 1:1. Směs byla ihned řádně promíchána a na ledu inkubována po dobu jedné hodiny. Po inkubaci byla solubilizovaná směs centrifugována na ultracentrifuze (Beckman-Coulter, USA) při 128 000x g při teplotě 4°C po dobu jedné hodiny. Získaný supernatant (non-DRM frakce) byl odebrán, alikvotován a poté uchován při -80°C pro další analýzy. Peleta byla resuspendována v 1 ml TME a zhomogenizována pomocí P-E sklo-teflonového homogenizátoru Eurostar per-b (IKA, Německo) při 1 200 rpm opakovaným

posunováním pístu (10x). Resuspendovaná peleta byla alikvotována, uložena při -80°C a dále analyzována (DRM frakce).

4.6 Stanovení množství proteinů

Množství proteinů bylo stanoveno v obou získaných frakcích s využitím kyseliny bicinchoninové - BCA. V této metodě se využívá schopnosti proteinů redukovat měďnaté ionty na ionty měďné (Smith et al., 1985), které v alkalickém prostředí reagují s BCA za vzniku barevného komplexu (fialová). Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci proteinu a je měřena spektrofotometricky při 562 nm.

4.6.1 Roztoky

Reagencie A (pH 11,25): 8% (w/v) monohydrát uhličitanu sodného, 1,6% (w/v) vínan sodný

Reagencie B: 4% (w/v) kyselina bicinchoninová (BCA)

Reagencie C: 4% (w/v) pentahydrát síranu měďnatého

Reakční činidlo - poměr reagensů: C:B:A = 1:25:26

Hovězí sérový albumin (BSA): koncentrace $c = 1$ mg/ml, koncentrace $c = 0,1$ mg/ml

4.6.2 Pracovní postup

Na mikrotitrační destičku byla napipetována kalibrační řada standardu BSA dle tab 5.

Tab. 5: Schéma přípravy BSA standardů na mikrotitrační destičku

č. standardu	SV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg BSA	0	0,5	1	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30
μl BSA (0,1 mg/ml)	-	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-
μl BSA (1 mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30
μl H ₂ O	100	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70

SV = slepý vzorek

Vzorky ke stanovení množství proteinů byly 1 000x naředěny a byly po 100 μl v tripletech napipetovány do jamek mikrotitrační destičky. Ke standardům a vzorkům bylo přidáno 100 μl reakčního činidla. Destička byla zakryta a inkubována po dobu 30 minut při 60°C.

Po inkubaci byla provedena kolorimetrická analýza přístrojem Synergy HT (BioTek Instruments, USA) při vlnové délce 562 nm a vyhodnocena v programu Gen 5.

4.7 SDS-PAGE elektroforéza a Western blotting

Pomocí SDS-PAGE elektroforézy bylo možné proteiny v obou získaných frakcích rozdělit pouze podle molekulové hmotnosti (Laemmli, 1970). Dodecylsírany sodný (SDS) udělí všem proteinům stejně velký záporný náboj. Jako rozdělovací pole se používá polyakrylamid, který vzniká polymerací akrylamidu s N,N'-metylenbisakrylamidem.

Metoda Western blotting slouží k elektroforetickému přenosu proteinů na nitrocelulóзовou membránu (Towbin et al., 1979). Na té se pak detekují jednotlivé proteiny pomocí specifických primárních protilátek. Primární protilátky jsou rozpoznány sekundárními protilátkami, které jsou označené enzymy, nejčastěji křenuvou peroxidasou. K vizualizaci se využívá chemiluminiscence v reakci katalyzované peroxidasou:



kde 3-APA je 3-aminofthalát a 3-APA[exc] je excitovaný stav 3-aminofthalátu.

4.7.1 Rostoky

Laemmliho vzorkový pufr (4x konc.): 0,24 M Tris, 10% (v/v) glycerol, 28 mM SDS, 2 mM DTT, 0,145mM bromfenolová modř

Pufr 1 - rozdělovací: 1,5 M Tris, pH 8,8

Pufr 2 - zaostřovací: 0,5 M Tris, pH 6,8

30% (w/v) akrylamid s 0,8% (w/v) N,N'-metylenbisakrylamid

10% (w/v) roztok SDS

10% (w/v) roztok APS

TEMED

Elektrodový pufr: 0,25 M Tris, 2 M glycin, 35 mM SDS,

TBS pufr (pH 8,0): 150 mM NaCl, 10 mM Tris

Blokovací pufr: TBS (pH 8,0), 5% (w/v) mléko, 0,1% (v/v) Tween-20

Ředící pufr: TBS (pH 8,0), 1% (w/v) mléko, 0,1% (v/v) Tween-20

Promývací pufr: TBS, 0,3% (v/v) Tween-20

Blotovací pufr: 25 mM Tris, 190 mM glycin, 20% metanol

4.7.2 Pracovní postup

Ke vzorkům byl přidán 4x koncentrovaný Leammliho vzorkový pufr v poměru 3:1. Poté byly naředěné vzorky umístěny na suchý blok (100°C) na 2 min.

Nejdříve byl připraven rozdělovací gel (10% nebo 15%) složený z roztoků podle tab. 6. Směs roztoků byla převrstvena roztokem butanolu (3 díly butanolu s 1 dílem vody). Polymerace probíhala přibližně 45 minut při laboratorní teplotě. Poté byl butanol vymyt. Zaostrovací gel (4%) byl připraven z roztoků podle tab. 6. Ihned po nanesení roztoku gelu byl shora vložen hřebínek s 10 zuby. Polymerace probíhala přibližně 15 minut při laboratorní teplotě. Do jednotlivých jamek byl nanesen standard, naředěné vzorky (10 µl v případě skupiny M 10, 8 µl v případě zbylých skupin) a kontrola podle tab. 7. Elektroforéza byla provedena v elektrodovém pufru na aparatuře MiniProtean Tetra cell (Bio-rad, USA) při konstantním napětí 200 V po dobu 45 - 60 minut. V době, kdy čelo dosáhlo konce gelu, byla elektroforéza zastavena.

Tab. 6: Schéma množství roztoků pro přípravu rozdělovacího a zaostrovacího gelu.

Rozdělovací gel 10%					
Voda	Pufr 1	Akrylamid	SDS	TEMED	APS
8,0 ml	5,0 ml	6,7 ml	200 µl	8 µl	90 µl
Rozdělovací gel 15%					
Voda	Pufr 1	Akrylamid	SDS	TEMED	APS
4,7 ml	5,0 ml	10,0 ml	200 µl	8 µl	90 µl
Zaostrovací gel 4%					
Voda	Pufr 2	Akrylamid	SDS	TEMED	APS
6,0 ml	2,5 ml	1,3 ml	100 µl	8 µl	90 µl

Tab. 7: Schéma rozložení vzorků na elektroforézu

Jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorek	Standard	Triton X-100 peleta	Triton X-100 cytosol	CHAPS peleta	CHAPS cytosol	Cholát peleta	Cholát cytosol	Na ₂ CO ₃ peleta	Na ₂ CO ₃ cytosol	Pozitivní/negativní kontrola

Po ukončení elektroforézy byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu BioTrace NT (Pall, Mexiko). Sendvič složený ze dvou pěnových podložek, dvou chromatografických papírů, gelu a membrány byl vložen do aparatury MiniProtean 3 cell (Bio-rad, USA) naplněné blotovacím pufrem. Western blot byl prováděn při 100 V po dobu 60 minut. Po skončení blotu, byla nitrocelulózová membrána ponechána v blokovacím pufru po dobu 30 minut. Membrána byla poté

inkubována přibližně 14 hodin při 4°C v primární protilátce. Ty byly ředěny 500-10 000x (podle protilátky) ředícím pufrům (tab. 8). Po skončení inkubace byla membrána několikrát řádně promyta vodou a následně 3x10 minut promývána promývacím pufrům. Poté proběhla inkubace v sekundárních protilátkách značených křenovou peroxidasou, která trvala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Sekundární protilátky byly ředěny ředícím pufrům 40 000x. Po skončení hodinové inkubace byla membrána opět několikrát řádně promyta vodou a poté promývacím pufrům 3x10 minut. Na membránu bylo nanášeno 250 µl substrátu luminol:peroxid vodíku (1:1, SuperSignal Westdura, Thermo Scientific, USA). Intenzita chemiluminiscence byla exponována na modrý X-ray film (AGFA, Belgie), který byl vyvolán na přístroji Optimax (Fomei, Německo).

Tab. 8: Seznam použitých primárních a na ně se vázající sekundárních protilátek, jejich ředění a obchodní označení

Detekovaný protein	Primární protilátka		Sekundární protilátka	
Charakterizace raftů	Název	Ředění	Název	Ředění
Caveolin 1	sc-894 (SCBt)	5000x	NA934V (GE-H)	40000x
Caveolin 2	sc-7942 (SCBt)	2000x	NA934V (GE-H)	40000x
Caveolin 3	sc-28828 (SCBt)	2000x	NA934V (GE-H)	40000x
Flotilin 1	sc-25506 (SCBt)	2000x	NA934V (GE-H)	40000x
Flotilin 2	sc-25507 (SCBt)	2000x	sc-2004 (SCBt)	40000x
CD 29	sc-8978 (SCBt)	2000x	NA934V (GE-H)	40000x
CD 71	sc-9099 (SCBt)	1000x	NA934V (GE-H)	40000x
CD 147	sc-25531 (SCBt)	2000x	sc-2004 (SCBt)	40000x
Signalizační proteiny				
KOR-1	sc-9112 (SCBt)	2000x	NA934V (GE-H)	40000x
DOR-1	sc-9111 (SCBt)	2000x	sc-2004 (SCBt)	40000x
AC VI	AP10187PU-N (AA)	500x	NA934V (GE-H)	40000x
AC V/VI	sc-590 (SCBt)	1000x	NA934V (GE-H)	40000x
Gα _{i1/2}	I1/2	3000x	NA934V (GE-H)	40000x
Gβ	sc-378 (SCBt)	10000x	NA934V (GE-H)	40000x
Gα _o	sc-387 (SCBt)	3000x	NA934V (GE-H)	40000x

SCBt = Santa Cruz Biotechnology (USA), GE-H = GE Healthcare (UK), AA = AcrisAntibodies (Německo), I1/2 = nekomerční protilátka

Vyvolané filmy byly naskenovány do počítače ve formátu „.tiff“ a následně byla intenzita jednotlivých pruhů vyhodnocena v programu ImageQuant (GE Healthcare, UK). Porovnávány byly intenzity DRM a non-DRM frakce. Tyto údaje byly graficky a statisticky zpracovány v programu GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA).

4.8 Stanovení aktivity adenylátcyklázy

Adenylátcykláza je enzym katalyzující přeměnu adenosintrifosfátu na cyklický adenosinmonofosfát, což je molekula řadící se do skupiny tzv. druhých posílů (Ishikawa and Homcy, 1997).

Stanovení enzymatické aktivity adenylátcyklázy (AC) bylo provedeno pomocí radioaktivně značeného ATP - [α - ^{32}P]ATP (Johnson et al., 1994). Pro získání [α - ^{32}P]cAMP byla použita adsorpční chromatografie, kde stacionární pevnou fází byl neutrální oxid hlinitý. Ten adsorbuje multivalentní nukleotidy, přičemž monovalentní, jako je cAMP, propouští. Účinnost kolony byla zjištěna pomocí [^3H]cAMP, který byl přítomen v reakční směsi.

Ve všech peletárních vzorcích byla stanovena basální a forskolinem indukovaná enzymová aktivita AC. Forskolin je látka nespecificky stimulující všechny typy AC (Ostrom et al., 2012).

4.9 Roztoky

Reakční směs: 48 mM Tris (pH 7,8), 2 mM MgCl_2 , 20 μM GTP, 0,8 mg/ml BSA, 40 μM IBMX, 5 mM KPEP, 3,2 U PK, 100 mM NaCl, 0,1 mM cAMP, 15 000 cpm [^3H]cAMP (uvedené jsou výsledné koncentrace v mikrozkušavkách při reakci)

Substrátová směs: 4 mM ATP, 160 000 cpm/ μl [α - ^{32}P]ATP

4.10 Pracovní postup

Na ledu byla připravena reakční směs z jednotlivých roztoků. Vzorky byly naředěny na koncentraci 1 mg/ml a uchovány na ledu. Byla také připravena substrátová směs obsahující 0,1 M ATP a [^{32}P]ATP. Experimenty byly prováděny v dupletech. Do jednotlivých mikrozkušavek byla napipetována reakční směs, voda a/nebo stimulátor (forskolin) a naředěný vzorek podle tab. 9 (zatím bez substrátové směsi) a vše řádně promícháno. Před přidáním substrátu byla každá mikrozkušavka s napipetovaným obsahem inkubována po dobu 1 minuty při 32°C. Poté bylo přidáno 10 μl substrátové směsi a po důkladném promíchání byly mikrozkušavky inkubovány 30 minut při 32°C. Přidáním směsi se nastartovala reakce. Následně byla reakce zastavena 200 μl 0,5 M HCl. Obsah mikrozkušavek byl poté povařen po dobu 5 min při teplotě 100°C. Dále byla směs neutralizována přidáním 200 μl 1,5 M imidazolu. Celkový obsah byl nanesen na kolonu obsahující aktivní neutrální oxid hlinitý 90 (Merck, Německo).

Objem byl převrstven 3 ml 10 mM imidazolu a ponechán při laboratorní teplotě. Po 30 min bylo k eluátu v scintilačních zkumavkách přidáno 7 ml scintilačního roztoku ROTISZINT® ecco plus (P-LAB, ČR).

Tab. 9: Schéma pipetování do jednotlivých zkumavek (bez substrátové směsi)

	Basální aktivita	Stimulovaná aktivita
	Objem V [μ l]	Objem V [μ l]
Reakční směs	40	40
Voda	30	20
Forskolin 0,1mM	-	10
Tkáň 1mg/ml	20	20

Obsah scintilačních zkumavek byl proměřen na radioaktivitu ^{32}P a ^3H kapalnou scintilační spektrometrií na přístroji Ray-Test (Německo). Výsledky byly graficky zpracovány v programu GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA).

5 Výsledky

5.1 Koncentrace proteinů v izolovaných frakcích

Koncentrace proteinů byla stanovena v obou získaných frakcích z jednotlivých skupin. Ty jsou vyobrazeny v tab. 10. Z výsledků lze pozorovat různé množství proteinů po solubilizaci jednotlivými látkami. Rozdíly byly detekovány i mezi kontrolní skupinou a skupinami ovlivněnými morfinem.

Tab. 10: Koncentrace proteinů v izolovaných frakcích z jednotlivých skupin

Koncentrace proteinů [mg/ml]						
Extrakční látka	Frakce	Skupiny				
		Kontrola	M 0,1	M 1	M 1,R	M 10
Triton X-100	P	3,0	5,1	2,5	4,8	3,6
	S	4,5	5,1	4,1	5,0	3,2
CHAPS	P	4,8	7,4	3,0	4,1	3,7
	S	3,9	5,2	4,8	5,2	3,0
Cholát	P	3,7	5,8	3,7	5,3	3,4
	S	3,8	5,5	4,8	4,7	2,8
Na ₂ CO ₃	P	4,2	6,6	4,1	5,6	4,0
	S	3,6	4,5	4,5	4,2	2,4

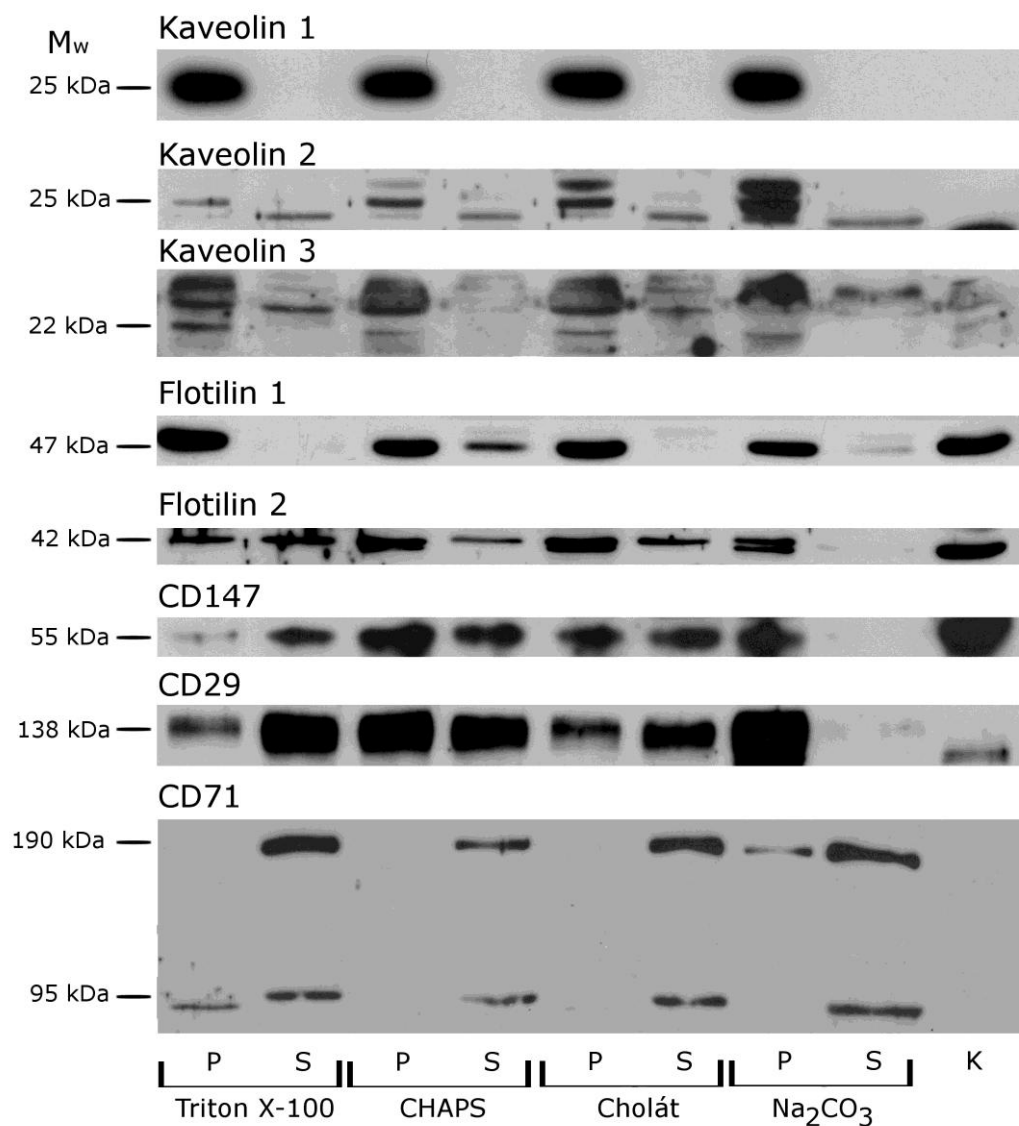
M = morfin, P = peleta, S = supernatant, čísla u skupin uvádějí podávanou dávku morfinu v jednotkách mg/kg/den

5.2 Charakterizace lipidových raftů

V této části bylo cílem zjistit, do jaké míry byla extrakce lipidových raftů úspěšná, a také porovnat rozdíly solubilizace při použití různých látek. V práci byly totiž použity tři různé typy detergentů (Triton X-100, CHAPS, cholát sodný) a jedna nedetergentová látka (uhličitan sodný, pH 11).

Pro hodnocení úspěšnosti solubilizace se použilo několik markerů membránových raftů. Byly aplikovány protilátky proti třem typům kaveolinu, které jsou obohaceny v tzv. kaveolární frakci lipidových mikrodomén. K identifikaci non-kaveolární části membránových raftů byly použity protilátky proti flotilinům, které se dělí na dva typy. Dále byla sledována také distribuce dvou vybraných markerových molekul, které by se měly přednostně vyskytovat v raftech, CD29 a CD147. CD29 je označení pro integrin

$\beta 1$ a CD147 pro emmprin neboli basigin. Také byla zkoumána distribuce běžného markeru non-lipidových mikrodomén označeného jako CD71 (transferinový receptor). Bylo vždy sledováno poměrné zastoupení těchto markerů peletárních frakcích (lipidových raftech) a v supernatantech (solubilizované proteiny membrán).



Obr. 9: Reprezentativní výřezy imunoblotů znázorňující distribuci jednotlivých markerů v získaných frakcích po solubilizaci různými typy extrakčních látek. CD = diferenční skupina (z angl. cluster of differentiation), P = peleta (DRM frakce), S = supernatant, K = pozitivní/negativní kontrola

Z obr. 9 je patrné, že distribuce všech tří typů kaveolinu převažuje v peletární frakci, která obsahuje právě detergent-rezistentní části membrány. Tato skutečnost je zřejmá u všech typů solubilizačních látek a u všech skupin analyzovaných vzorků. Kaveolin 3

podle výrobce dodávajíc příslušnou protilátku lze detekovat v rozmezí velikostí od 20 do 25 kDa. Obsah kaveolinu 3 v peletární frakci evidentně převyšoval množství tohoto proteinu v supernatantu.

Flotilin 1 se také převážně vyskytoval pouze ve frakci bohaté na lipidové rafty. V tomto případě se detergent CHAPS liší od ostatních solubilizačních látek, kde bylo možné sledovat i slabší signál ve frakci supernatantu. Flotilin 2 byl dostupnou protilátkou obtížně detekovatelný. Z výsledků lze vyčíst rovnocennou lokalizaci v obou frakcích při použití Tritonu X-100. U ostatních solubilizačních činidel převládal signál v peletární frakci. Toto bylo také možno pozorovat především po použití uhličitanu sodného.

CD147 měl v peletě výrazně silnější signál u extrakce uhličitanem. Mírnější rozdíl byl při použití CHAPS. Zatímco u cholátu byl signál rozložen rovnoměrně mezi oběma frakcemi, Triton X-100 tento protein výrazně solubilizoval.

Extrakce CD29 u jednotlivých solubilizačních látek byla také rozdílná. Při použití Tritonu X-100 byl tento protein stejně jako v případě CD147 více lokalizován v supernatantu. Podobně, i když v menší míře, tomu bylo u vzorků ovlivněných cholátem. Při solubilizaci uhličitanem sodným a CHAPS se marker CD29 objevil mezi oběma frakcemi rovnoměrně, tak jako tomu bylo u CD147.

Monomer CD71 s velikostí 95 kDa i dimer téhož markeru (190 kDa) byl pozorován téměř výlučně v supernatantu. Signál monomerů transferinového receptoru při použití Tritonu X-100 v peletární frakci byl velmi slabý a lehce posunutý. V peletě byl po použití non-detergentové extrakce také detekován slabší signál dimerů CD71.

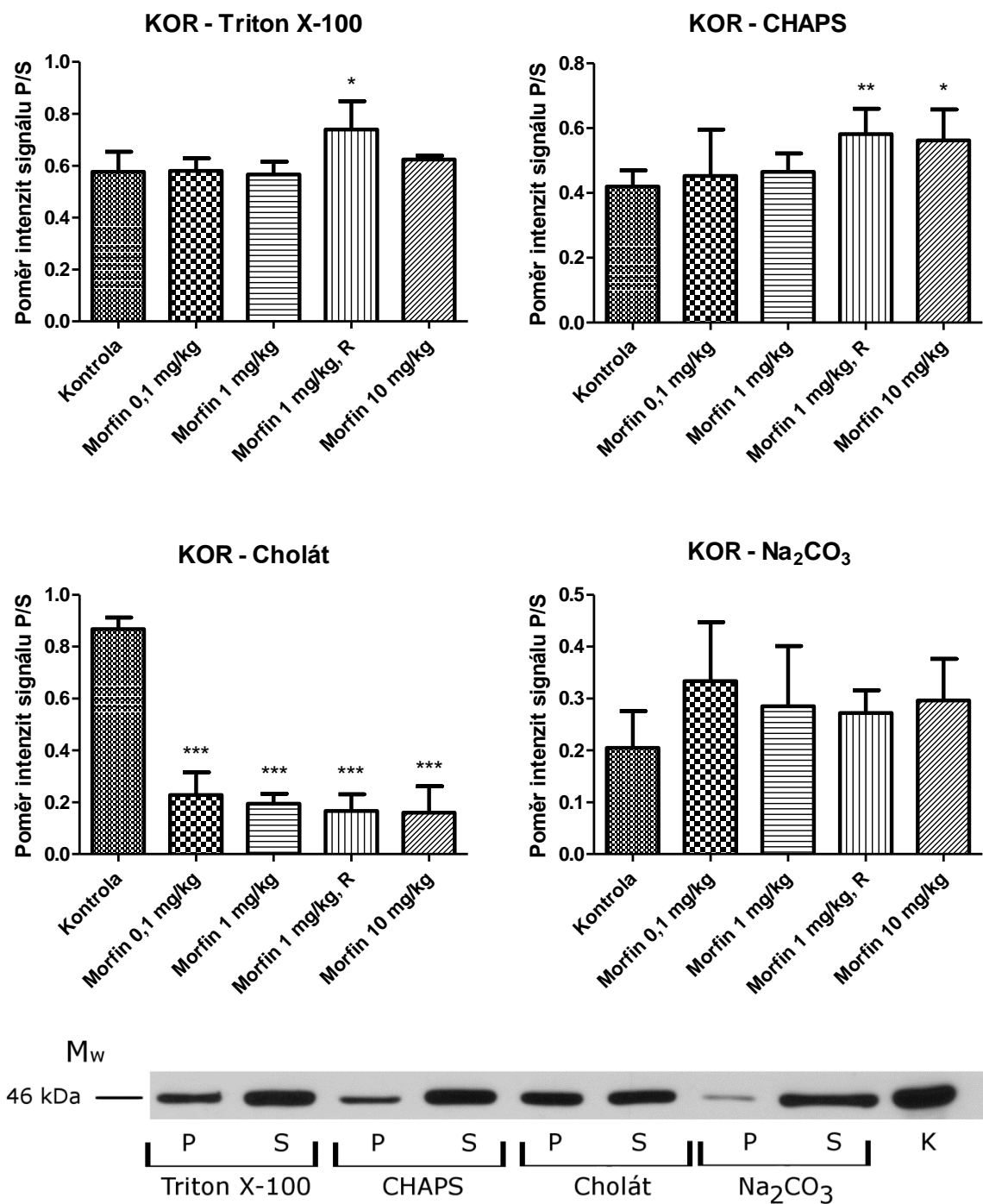
5.3 Vliv morfinu na zastoupení signalizačních molekul v lipidových raftech

Byl sledován vliv různých dávek morfinu na distribuci signalizačních molekul opioidního systému v myokardu potkana a výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou. Zkoumána byla cAMP/AC signalizační kaskáda jednak ve frakci bohaté na lipidové rafty jednak ve frakci supernatantu. Dále bylo sledováno, jaký vliv na extrakci signalizačních molekul má použití daného solubilizačního činidla.

5.3.1 KOR

U všech použitých extrakčních látek byla intenzita signálu označující KOR vždy větší na straně supernatantu (obr. 10). Při porovnávání s kontrolní skupinou je vidět, že KOR byl nejvíce solubilizován zásaditým roztokem uhličitanu sodného. Naopak nejméně extrahován byl v případě použití cholátu.

Při porovnávání vlivu morfinu na distribuci receptoru bylo možné u Tritonu X-100 pozorovat signifikantní zvýšení poměru u vzorku ovlivněného střední dávkou morfinu - 1 mg/kg/den po dobu 28 dní s regresí jeden týden. Tento jev bylo možné pozorovat i po solubilizaci CHAPS, kde změna měla vyšší signifikanci. V případě použití CHAPS došlo i ke statisticky významnému zvětšení po podání vyšší dávky morfinu po kratší dobu - 10 mg/kg/den po dobu 10dní. U solubilizace cholátem došlo u „morfinových vzorků“ oproti kontrole k velmi výraznému rozdílu, kdy poměr pelety se supernatantem klesl z 0,86 na hodnotu kolem 0,2. U vzorků extrahovaných zásaditým roztokem uhličitanu sodného nedošlo k žádným signifikantním změnám.



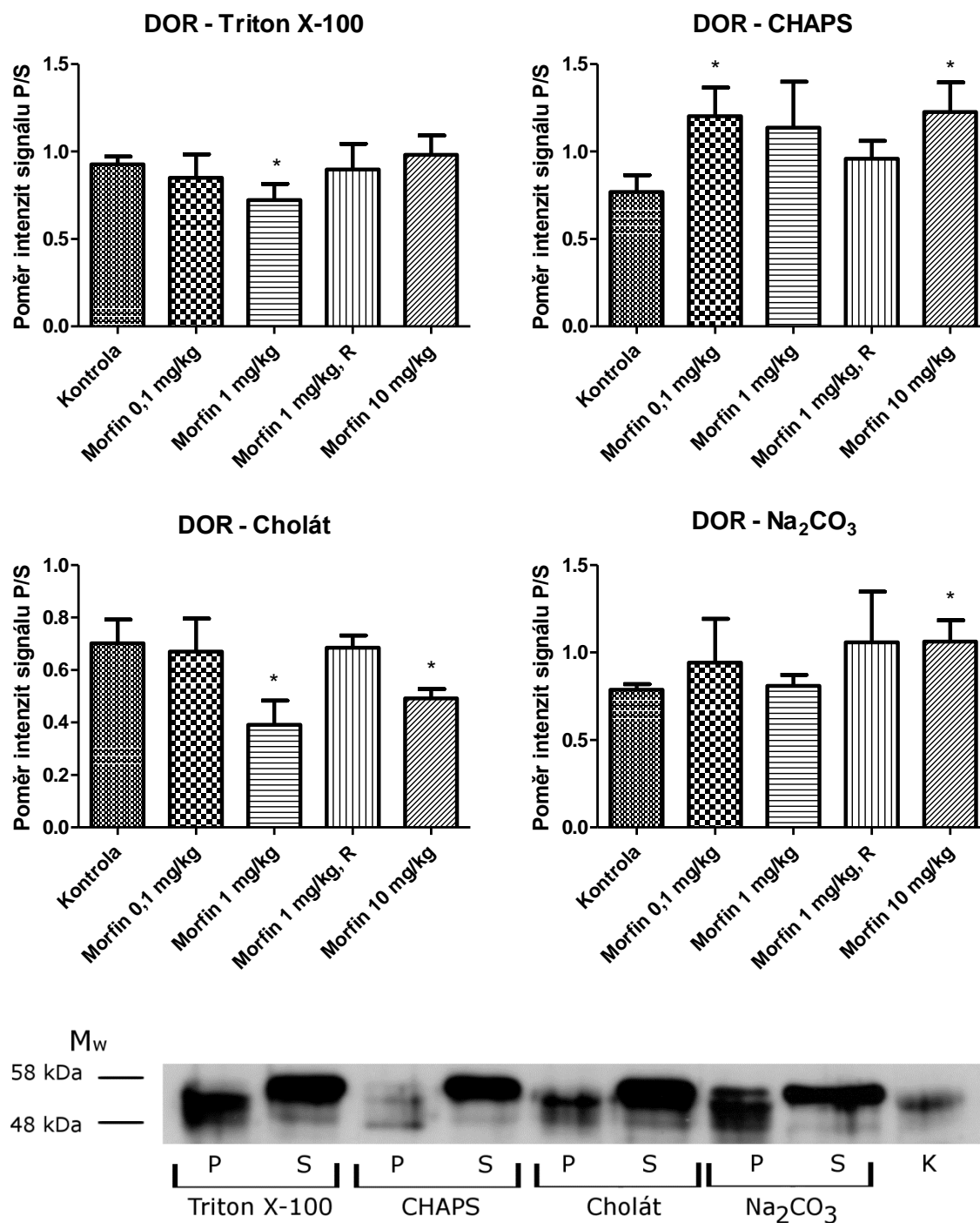
Obr. 10: Grafy znázorňují distribuci KOR v lipidových raftech. Distribuce je vyjádřena poměrem intenzit signálu v peletě a supernatantu po solubilizaci vzorků myokardu potkana různými extrakčními roztoky. Porovnávána byla distribuce KOR u kontroly a jednotlivými, morfinem ovlivněnými, skupinami. V dolní části obrázku se nachází reprezentativní imunoblot (výřez) znázorňující distribuci KOR ve frakcích získaných po solubilizaci různými typy extrakčních látek. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (porovnávána kontrolní skupina se skupinami ovlivněnými morfinem). P = peleta, S = supernatant, K = pozitivní kontrola

5.3.2 DOR

DOR při porovnávání vzorků z kontrolních skupin vykazoval rozdílné rozložení v izolovaných frakcích po použití jednotlivých extrakčních látek. Opět nebylo dosaženo poměru většího než jedna, tedy distribuce byla na straně supernatantu větší. Receptor byl nejméně solubilizován při použití Tritonu X-100. U ostatních látek se poměr pohyboval kolem hodnoty 0,75.

Extrakcí Tritonem X-100 došlo k signifikantnímu poklesu poměru u vzorků připravených ze zvířat, kterým byl podáván morfin po dobu 28 dnů se střední dávkou 1mg/kg/den. Stejný výsledek byl získán i při solubilizaci cholátem. U toho detergentu šlo pozorovat pokles poměru i u skupiny ovlivněné po kratší dobu (10 dnů) vyšší dávkou morfinu - 10mg/kg/den. Při použití detergentu CHAPS došlo naopak k navýšení poměru, který přesáhl hodnotu jedna, což značí větší výskyt v peletě. Statisticky významné změny bylo možné pozorovat ve vzorcích získaných z potkanů, kterým byl dlouhodobě aplikován morfin v nižší dávce - 28 dní 0,1 mg/kg/den a u zvířat, kterým byla podávána vysoká dávka (10 mg/kg/den) morfinu po kratší dobu (10 dní). U non-detergentové solubilizace došlo k signifikantnímu nárůstu poměru z 0,78 na 1,06 opět u skupiny ovlivněné vyšší dávkou morfinu.

Zajímavým zjištěním byl nález určitého posunu signálu DOR v non-raftové frakci, což je patrné na výřezu reprezentativního imunoblotu (obr. 11). V této frakci byl receptor detekován v oblasti standardu o velikosti 58 kDa. V peletě byl signál zaznamenán v oblasti standardu o velikosti 48 kDa. Tento jev byl vizualizován u všech použitých solubilizačních roztoků.



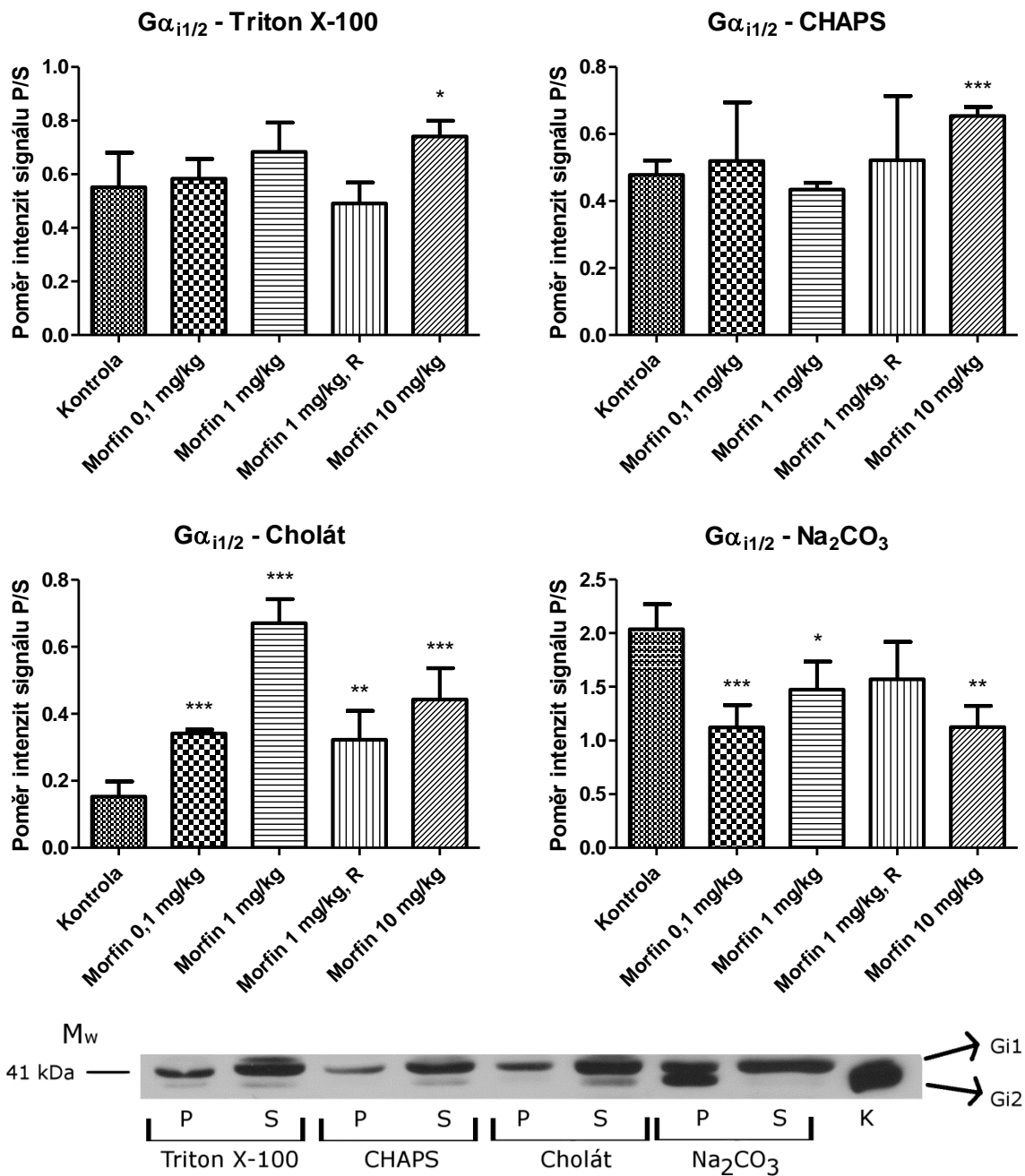
Obr. 11: Grafy znázorňují distribuci DOR v lipidových raftech. Distribuce je vyjádřena poměrem intenzit signálu v peletě a supernatantu po solubilizaci vzorků myokardu potkana různými extrakčními roztoky. Porovnávána byla distribuce DOR u kontroly a jednotlivými, morfinem ovlivněnými, skupinami. V dolní části obrázku se nachází reprezentativní imunoblot (výřez) znázorňující distribuci DOR v získaných frakcích po solubilizaci různými typy extrakčních látek. * $p < 0,05$ (porovnávána kontrolní skupina se skupinami ovlivněnými morfinem). P = peleta, S = supernatant, K = pozitivní kontrola

5.3.3 $G\alpha_{i1/2}$

Rozdílnou extrakci jednotlivými solubilizačními činidly vykazuje i inhibiční α podjednotka G-proteinu typu 1 a 2. Výraznější signál v peletární frakci bylo možné nalézt při solubilizaci alkalickým roztokem uhličitanu sodného. U detergentů byl poměr nižší a výskyt tohoto proteinu v supernatantní frakci tedy větší. Při porovnání kontrolních skupin cholát výrazně solubilizoval tento G-protein. CHAPS a Triton X-100 extrahovaly tento protein méně.

Solubilizace Tritonem X-100 u vzorků myokardu připravených z potkanů ovlivněných morfinem oproti kontrolní skupině signifikantně klesla pouze u vyšší dávky morfinu 10 mg/kg/den po kratší dobu podávání (10 dnů). Tento výsledek bylo možné pozorovat i po použití detergentu CHAPS, kde byla signifikance rozdílu výrazně vyšší. U cholátu byla distribuce oproti kontrolní skupině zřetelně odlišná. Výraznou signifikance bylo možno vidět při dlouhodobém podávání (28 dní) nízké a střední dávky morfinu. U dávky 1 mg/kg/den došlo dokonce k nárůstu poměru z 0,15 na 0,67. Vysoká signifikance byla pozorována i u skupiny ovlivněné vyššími dávkami morfinu po kratší dobu. Nižší signifikance byla pak pozorována u vzorků z potkanů, kteří byli usmrceni po týdenní abstinenci (vysazení morfinu po poslední dávce). Změny byly detekovány i při použití non-detergentové solubilizace. Poměr zde neklesl pod hodnotu 1, ale výsledek při dlouhodobé aplikaci nižší dávky morfinu se k tomuto číslu blížil. Oproti kontrole byl tedy zaznamenán výrazně signifikantní pokles. Méně statisticky významný pokles poměru byl pozorován u vyšší dávky morfinu a malá signifikance byla i u střední dávky morfinu.

Z výsledků získaných z elektroforetického rozdělení proteinů a následného Western blotu je patrné, že sledované inhibiční G-proteiny ($G\alpha_{i1}$ a $G\alpha_{i2}$) se rozdělily a vytvořily samostatné signály (obr. 12). Spodní proužek, velikostně menší, náleží $G\alpha_{i2}$. Vrchní indikuje přítomnost $G\alpha_{i1}$. Bylo možné pozorovat silnější signál $G\alpha_{i1}$ oproti $G\alpha_{i2}$ ve vzorcích myokardu. U pozitivní kontroly (hrubé membrány mozkové tkáně) byla intenzita signálu opačná. Silný signál $G\alpha_{i2}$ byl detekován v peletě po solubilizaci zásaditým roztokem uhličitanu sodného. V posuzování poměru signálu mezi oběma frakcemi byly oba typy $G\alpha_i$ stanovovány společně.

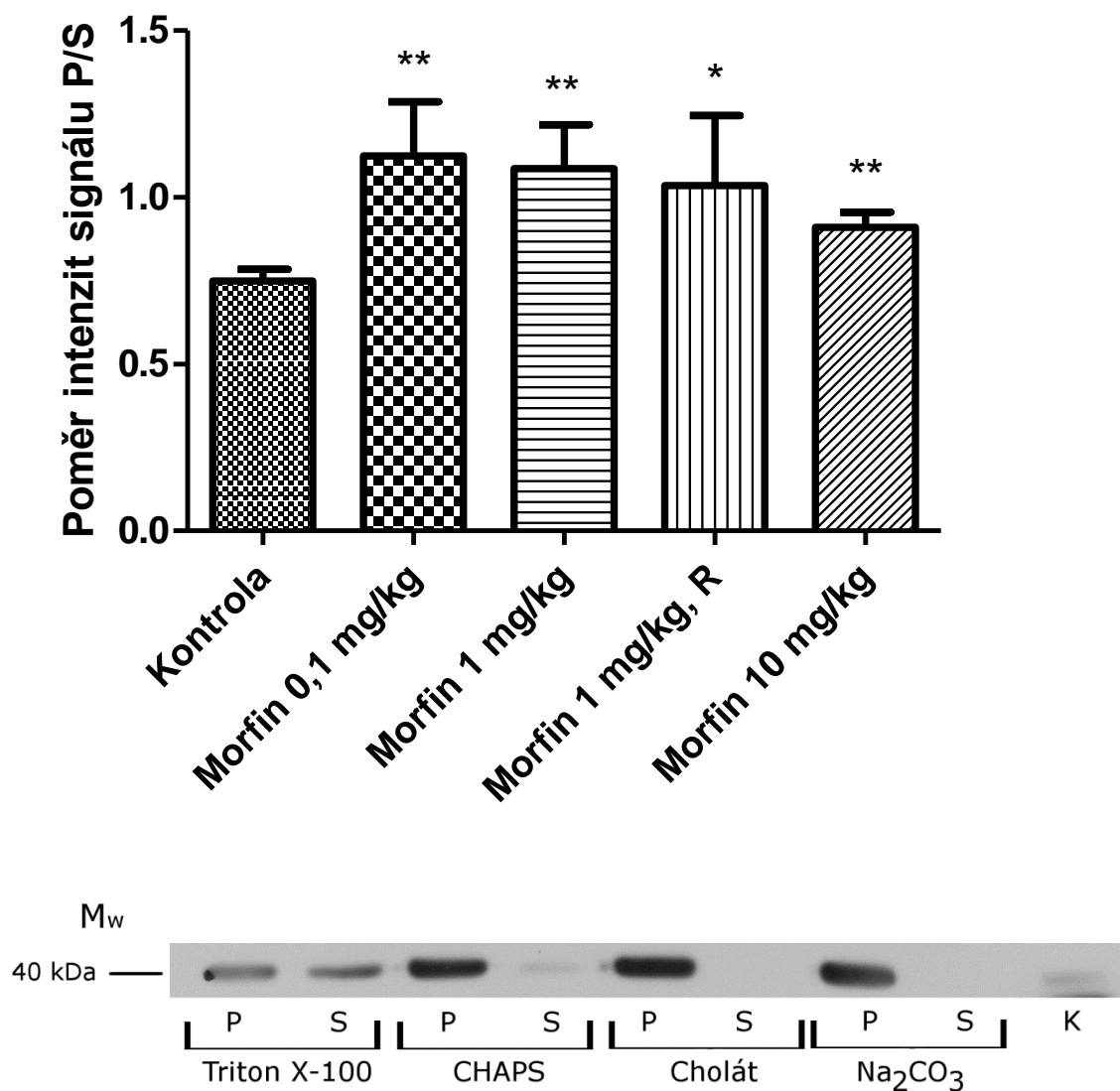


Obr. 12: Grafy znázorňují distribuci Gα_{i1/2} v lipidových raftech. Distribuce je vyjádřena poměrem intenzit signálu v peletě a supernatantu po solubilizaci vzorků myokardu potkana různými extrakčními roztoky. Porovnávána byla distribuce Gα_{i1/2} u kontroly a jednotlivými, morfinem ovlivněnými, skupinami. V dolní části obrázku se nachází reprezentativní imunoblot (výřez) znázorňující distribuci Gα_{i1} a Gα_{i2} v získaných frakcích po solubilizaci různými typy extrakčních látek. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 (porovnávána kontrolní skupina se skupinami ovlivněnými morfinem). P = peleta, S = supernatant, K = pozitivní kontrola

5.3.4 $G\alpha_o$

Další inhibiční α podjednotka G-proteinu je typu o. Triton X-100 jako jediný detergent dokázal tento protein solubilizovat (obr. 13). Extrakce nebyla úspěšná ani při použití alkalického roztoku uhličitanu sodného. U kontrolního vzorku byl výskyt vyšší v supernatantu. Byly detekovány signifikantní změny distribuce u morfinem dlouhodobě ovlivněných zvířat, kde poměr mírně vystoupal nad hodnotu 1, což značí nepatrně větší výskyt $G\alpha_o$ v lipidových raftech. Tato změna se statisticky významně projevila u slabší a střední dávky morfinu. U vzorku po vysazení morfinu (regrese) byla signifikance slabší, a poměr vypovídal o rovnoměrné distribuci mezi oběma frakcemi. Vyšší dávka morfinu po kratší dobu také ovlivnila distribuci. Došlo ke statisticky významnější změně, přičemž výskyt tohoto proteinu mírně převládal na straně supernatantu.

$G\alpha_o$ - Triton X-100

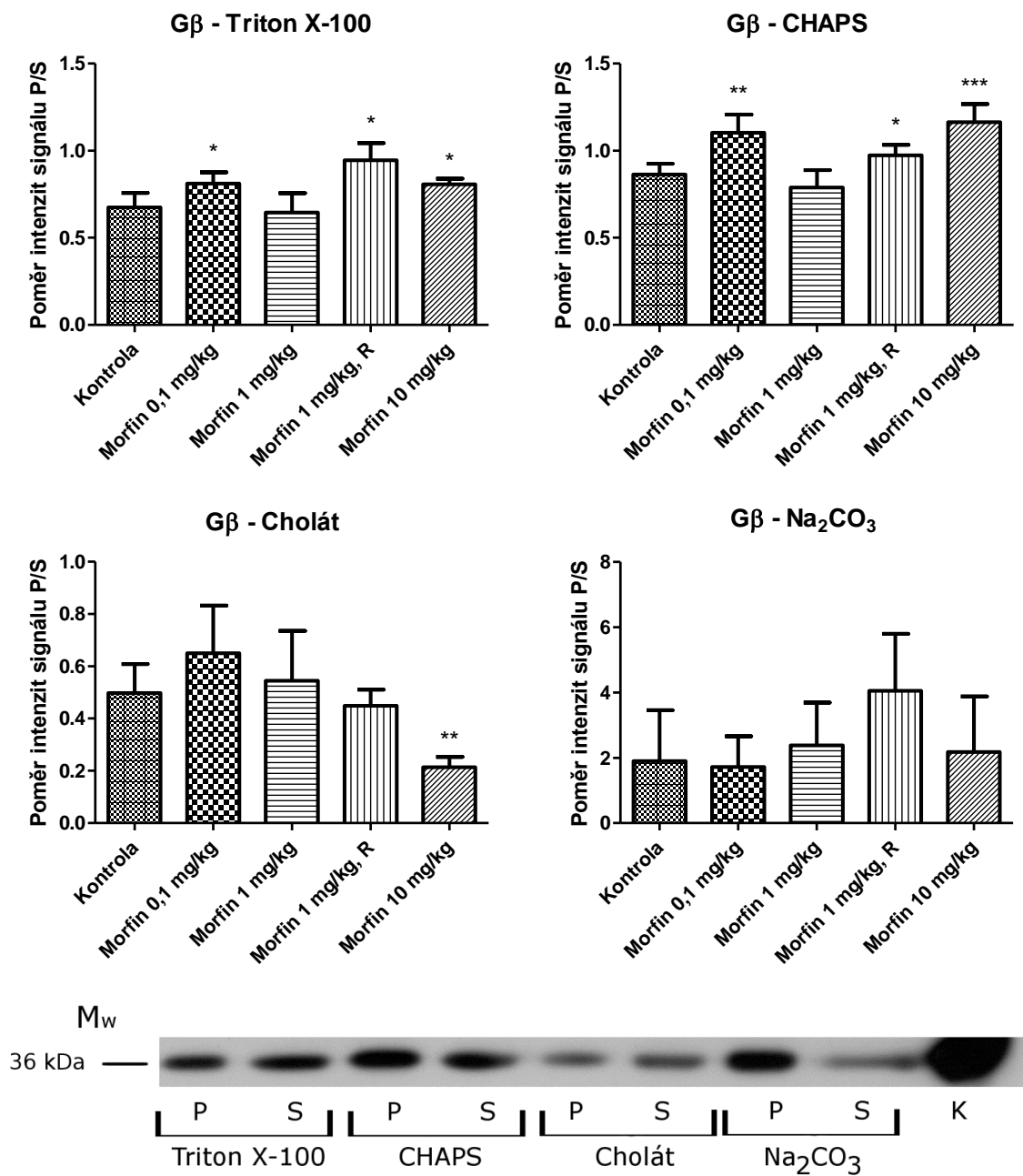


Obr. 13: Graf znázorňuje distribuci $G\alpha_o$ v lipidových raftech. Distribuce je vyjádřena poměrem intenzit signálu v peletě a supernatantu po solubilizaci vzorků myokardu potkana neiontovým Tritonem X-100. Porovnávána byla distribuce $G\alpha_o$ u kontroly a jednotlivými, morfinem ovlivněnými, skupinami. V dolní části obrázku se nachází reprezentativní imunoblot (výřez) znázorňující distribuci $G\alpha_o$ v získaných frakcích po solubilizaci různými typy extrakčních látek. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (porovnávána kontrolní skupina se skupinami ovlivněnými morfinem). P = peleta, S = supernatant, K = pozitivní kontrola

5.3.5 G β

β podjednotka G-proteinů také vlivem různých solubilizačních roztoků měnila svůj výskyt mezi lipidovými rafty a mimo ně. Srovnáním kontrolních vzorků bylo možné zjistit nejmenší extrakci této podjednotky non-detergentovým způsobem. Více extrahována byla detergenty, především cholátem. U CHAPS se poměr blížil k 1, ale signál byl přeci jen silnější na straně supernatantu.

U Tritonu X-100 bylo možné sledovat signifikantní nárůst poměru u vzorků ze skupin zvířat, kterým byla podávána nízká dávka morfinu a střední dávka s následným vysazením (regresí). Podobný nárůst jako u nízké dávky bylo možné vidět i po podání vysoké dávky morfinu po kratší dobu. Po solubilizaci vzorků ovlivněných morfinem detergentem CHAPS bylo možné pozorovat podobný trend jako v případě prvního popsaného detergentu. Statisticky významnější nárůst poměru byl zaznamenán po podání nízké dávky morfinu, kdy byl výskyt G β vyšší v peletě. V lipidových raftech byl silnější signál i v případě skupiny ovlivněné vysokou dávkou morfinu. U vzorků připravených ze skupiny potkanů po vysazení morfinu došlo k malému signifikantnímu nárůstu poměru. V případě cholátu bylo možné pozorovat výrazný pokles intenzity signálu na straně pelety, a to u skupiny, které byla podávána vysoká dávka morfinu. U solubilizace non-detergentovým způsobem nebyla pozorována žádná statisticky významná změna oproti kontrolní skupině.



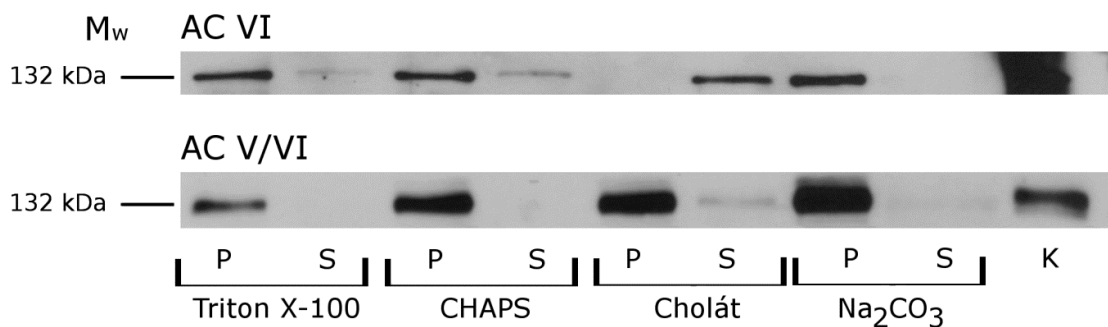
Obr. 14: Grafy znázorňují distribuci Gβ v lipidových raftech. Distribuce je vyjádřena poměrem intenzit signálu v peletě a supernatantu po solubilizaci vzorků myokardu potkana různými extrakčními roztoky. Porovnávána byla distribuce Gβ u kontroly a jednotlivými, morfinem ovlivněnými, skupinami. V dolní části obrázku se nachází reprezentativní imunoblot (výřez) znázorňující distribuci Gβ v získaných frakcích po solubilizaci různými typy extrakčních látek. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (porovnávána kontrolní skupina se skupinami ovlivněnými morfinem). P = peleta, S = supernatant, K = pozitivní kontrola

5.3.6 AC

Stanovovány byly dva typy AC - V a VI. Použity byly dvě protilátky, z nichž jedna detekovala obě izoformy a druhá pouze typ VI.

Výsledky při použití protilátky rozeznávající obě izoformy AC jasně ukázaly vyšší výskyt této molekuly v lipidových raftech a to v případě tří použitých solubilizačních roztoků - Tritonu X-100, CHAPS a uhličitanu sodného. Jedině ve vzorcích extrahovaných cholátem byl vidět slabý signál i v supernatantu. Tento trend se objevoval ve vzorcích všech zkoumaných skupin.

Detekce samotné AC typu VI ukázala podobné výsledky. Slabší intenzita signálu v supernatantu byla pozorována v případě solubilizace neiontovým Tritonem X-100 a zwitteriontovým CHAPS. U vzorků extrahovaných cholátem nebyl detekován signál v peletární frakci, ale pouze v supernatantu.



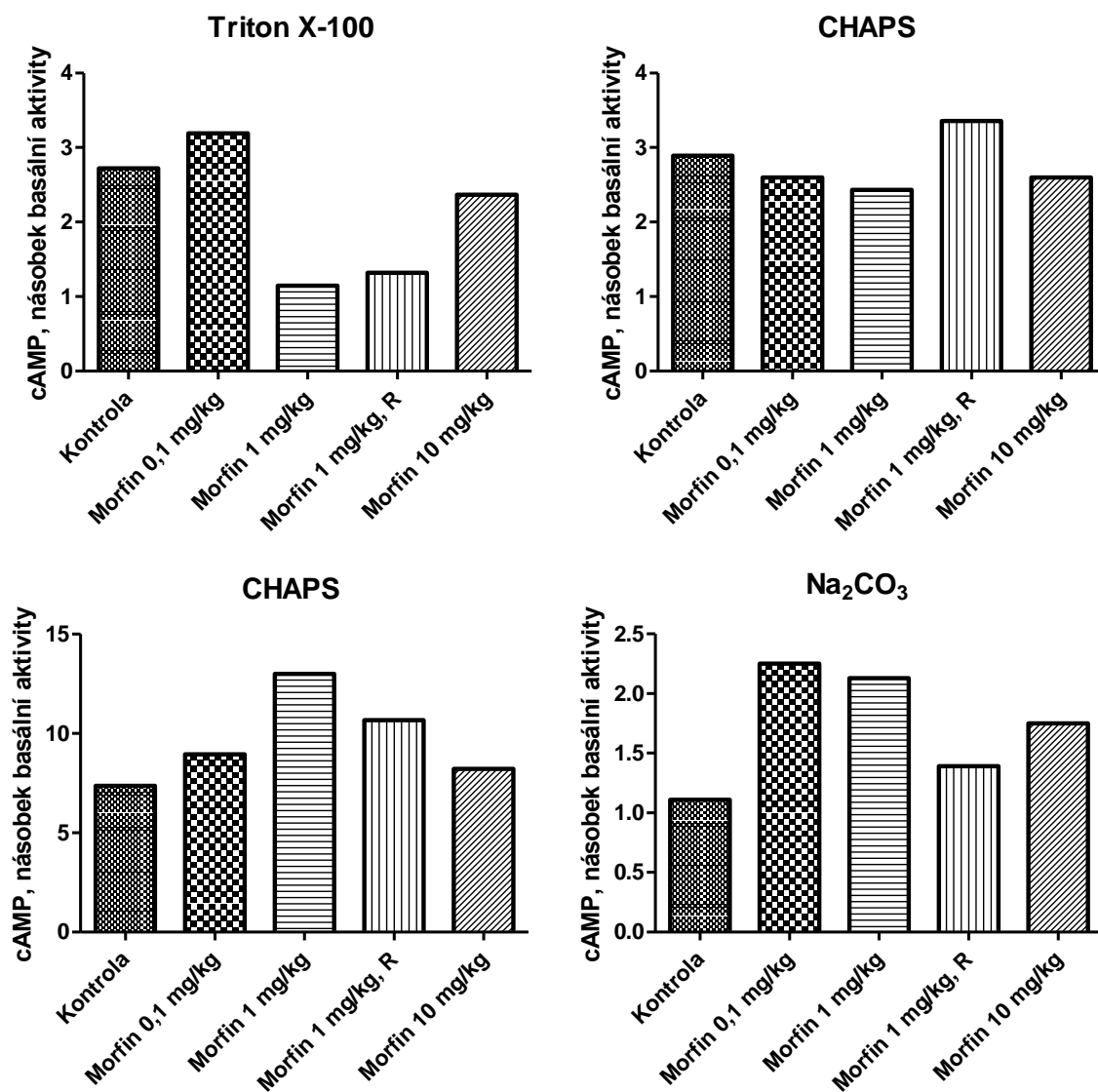
Obr. 15: Reprezentativní imunoblot (výřez) znázorňující distribuci samostatné AC typu VI a distribuci dvou spojených izoform V a VI v získaných frakcích po solubilizaci různými typy extrakčních látek. P = peleta, S = supernatant, K = pozitivní kontrola

5.4 Stanovení basální a stimulované aktivity AC

Kromě distribuce AC v lipidových raftech bylo předmětem výzkumu i stanovení bazální a forskolinem stimulované aktivity AC. Aktivita enzymu byla zkoumána v peletární frakci po solubilizaci jednotlivými typy extrakčních látek. Měřeny byly vzorky z kontrolních i morfinem ovlivněných skupin. Stanovení bylo provedeno pomocí radioaktivně značeného ATP ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) a produkt ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$) byl měřen scintilační spektrometrií. Z důvodu nedostatku materiálu se jedná pouze o předběžné výsledky.

Z výsledků je patrné, že aktivita AC po stimulaci forskolinem oproti bazální byla navýšena u všech použitých detergentů. Největší změna byla pozorována

v membránových raftech po solubilizaci cholátem, kdy bylo po stimulaci dosaženo až třináctinásobku bazální aktivity enzymu. Ostatní extrakční látky vykazují podobné výsledky. Morfin, jak je patrné z grafů, měl vliv na poměr aktivit, ale z důvodů nedostatku materiálu nebylo možné tyto změny statisticky prokázat.



Obr. 16: Grafy znázorňující nárůst forskolinem stimulované aktivity AC jako násobek basální aktivity. Produkce cAMP byla stanovována v peletárních frakcích po solubilizaci různými extrakčními činidly. Změny v produkci byly také posuzovány mezi kontrolou a jednotlivými, morfinem ovlivněnými, skupinami. S = stimulovaná aktivita, B = bazální aktivita, R = regrese

6 Diskuze

V této diplomové práci bylo hlavním cílem zjistit vliv morfinu na distribuci signálních molekul opioidního systému v lipidových raftech připravených ze vzorků tkáně myokardu potkana. Prvním úkolem bylo charakterizovat účinnost jednokrokové izolace mikrodomén za použití různých solubilizačních látek. V neposlední řadě šlo i o stanovení aktivity adenylátcyklázy, jako klíčového efektoru opioidního systému. Pokusy byly prováděny na potkanech kmene Wistar, kterým byla podána různě vysoká dávka morfinu. Zvířata byla usmrcena následně (24 hodin po aplikaci poslední dávky morfinu) nebo až po 1 týdnu od vysazení morfinu z důvodu pozorování možného přetrvávání účinku ligandu. Morfin byl podáván po dobu 10 nebo 28 dnů v různé dávce. Tato doba byla zvolena na základě výsledků předběžných experimentů z naší laboratoře naznačujících určitý kardioprotektivní účinek při podávání nižších dávek morfinu (0,1 nebo 1 mg/kg), který se projevuje teprve při dlouhodobější aplikaci této látky. Je zřejmé, že při navození kardioprotektivního účinku morfinu hraje nějakou roli opioidní signalizace, jejíž komponenty mohou být lokalizovány v lipidových raftech. Při použití vysokých dávek může být vliv na myokard patrný už po 10 dnech, ale za těchto podmínek dochází také k nežádoucímu vzniku tolerance a závislosti (Bourova et al., 2010).

Morfin jako agonista OR ovlivňuje signální systém těchto receptorů. Je známo, že dlouhodobějším působením agonisty na receptor dochází k jeho desenzitizaci, následovanou internalizací receptoru a dalších signálních molekul, které mohou být degradovány nebo reinkorporovány zpátky do plazmatické membrány (Koch and Höllt, 2008). V tomto případě se mluví o tzv. down-regulaci popř. up-regulaci, tedy snížení popř. zvýšení celkového počtu určitého proteinu. Kromě internalizace dané signální molekuly můžou koncentraci receptoru ovlivnit i změny na úrovni exprese. U morfinu není vliv na koncentraci proteinů zatím zcela jasně prokázán, výsledky *in vitro* a *in vivo* pokusů se totiž liší (Zadina et al., 1995; Yabaluri and Medzihradsky, 1997).

V mikrodoménách bohatých na sfingolipidy a cholesterol charakterizovaných jako fáze l_o se objevují proteiny, které na sobě nesou GPI kotvu a zbytky kyseliny myristové nebo popř. palmitové (Brown and London, 1998; Resh, 2004). Především palmitoylace jako reverzibilní modifikace je velmi dynamický proces (Petäjä-Repo et al., 2006).

Proteiny jsou palmitoylovány během posttranskripčních modifikací i přímo na membráně, což je na agonistovi závislý proces, kde právě přítomnost ligandu zvyšuje rychlost obratu této modifikace.

V diplomové práci byla sledována morfinem vyvolaná změna distribuce základních komponent opioidní signalizace, mezi které patří receptory, příslušné G-proteiny a cílový efektor - AC. Je známo, že některé neurotransmitery popř. hormony po interakci s příslušným receptorem a aktivací následné signální kaskády způsobují translokaci těchto struktur do membránových mikrodomén, což u morfinu nebylo dosud popsáno (Chini and Parenti, 2004).

K extrakci lipidových raftů byla použita trochu odlišná metodika oproti běžně používanému sacharózovému gradientu (Rubin and Ismail-Beigi, 2003). Jedná se o jednoduchou extrakci, kde je solubilizovaná tkáň centrifugována na ultracentrifuze při 128 000x g za teploty 4°C. K prohloubení znalostí membránové problematiky byly využity čtyři extrakční látky s rozdílnými vlastnostmi. Jedním ze tří detergentů byl neiontový Triton X-100, který je v literatuře považován za nejúčinnější a spolehlivou látku při výzkumu lipidových domén (Schuck et al., 2003). Na základě těchto předchozích výzkumů byl CHAPS také určen za seriózní detergent vhodný pro izolaci membránových mikrodomén. Třetím a posledním detergentem použitým v této diplomové práci byl cholát, který není běžně k extrakci těchto částí membrán používán. V naší práci byla využita i solubilizace zásaditým roztokem uhličitanu sodného (Song et al., 1996).

Při porovnávání účinnosti extrakce bylo sledováno několik proteinů, které se řadí mezi markery lipidových raftů. Byly detekovány i proteiny vyskytující se spíše mimo tyto domény a jedna struktura striktně obsažená v solubilizované frakci. Hlavní složka kaveolární části membránových raftů je protein menší velikosti - kaveolin. Znány jsou tři typy, přičemž kaveolin 3 je specifický pro svaly (Tang et al., 1996). Z výsledků je patrné, že se podařilo tyto proteiny výlučně detekovat v peletární frakci, což naznačuje úspěšnost extrakce. U jednotlivých typů solubilizačních látek nebyl pozorován žádný zásadní rozdíl. Dalším typickým proteinem lipidových raftů je flotilin (Zhao et al., 2011). Ten je, jak vyplývá z literatury, složkou non-kaveolární části mikrodomén. I u tohoto proteinu je z výsledků zřejmé, že je ve větší míře obsažen v peletární části (obr. 9). Bylo samozřejmě potřeba ověřit, zda solubilizace proběhla správným způsobem. K tomuto zjištění posloužily dva proteiny značené CD29 a CD147, které se podle předchozích prací z naší laboratoře typicky objevovaly v solubilizované frakci

(Pesanová et al., 1999). Tento způsob distribuce se v současné práci nepotvrdil, což může být způsobeno použitím odlišného typu tkáně, popř. rozdílnou metodikou izolace membránových mikrodomén. Některé novější výzkumy dokonce tyto struktury přisuzují do lipidových raftů (Salani et al., 2009; Grass et al., 2012), což potvrzují i výsledky z tohoto experimentu. K potvrzení úspěšnosti extrakce bylo proto nutné detekovat jinou strukturu. K tomu posloužila molekula CD71 neboli transferinový receptor, který je brán jako ideální kontrolní protein objevující se především v solubilizované frakci (Shogomori and Brown, 2003). Na membráně se objevuje v podobě homodimerů (Cheng et al., 2004). V naší práci byly detekovány monomery i dimery. Z výsledku je jasně patrné, že distribuce tohoto markeru převažovala na straně supernatantu a to u všech extrakčních látek, což spolu s distribucí kaveolinu a flotilinu potvrzuje úspěšnost izolace. Při porovnání jednotlivých detergentů lze podle raftových a non-raftových markerů usoudit, že všechny použité solubilizační látky splnily úlohu a je možné s nimi dosáhnout extrakce DRM. Z výsledků CD29 a CD147, tedy proteinů obsažených v obou získaných frakcích, lze pozorovat rozdílnou sílu solubilizace. Triton X-100 je možné označit za nejsilnější činidlo. Naopak solubilizace uhličitanovou metodou se zdá jako nejšetrnější. U CHAPS je možné, že byla použita nízká koncentrace (1% (w/v)), v literatuře se objevuje i použití 4% roztoku této látky pro účely solubilizace proteinů (Schuck et al., 2003). Cholát, který se jako extrakční látka běžně nepoužívá, se ukázal jako potenciálně vhodné činidlo pro získání lipidových raftů.

Ze signálních molekul byly detekovány dva receptory opioidního typu - KOR a MOR. MOR byl sice nedávno na srdci nalezen i u dospělých jedinců, ale jeho koncentrace je tak nízká, že se nepředpokládá jeho výrazný vliv na srdeční činnost (Head et al., 2005). Je známo, že GPCR, kam patří i opioidní receptory, mohou být lokalizovány v lipidových raftech (Head et al., 2005). V membránových mikrodoménách byl KOR nalezen např. v CHO buňkách (Xu et al., 2006). Pro solubilizaci byla v tomto případě použita uhličitanová metoda. V našem experimentu se KOR ve větší míře nacházel v solubilizované frakci a míra rozdělení mezi membránovými mikrodoménami a supernatantem byla rozdílná po extrakci jednotlivými činidly. Tento jev je způsoben rozdílnými vlastnostmi detergentů a uhličitanu, díky kterým dokážou proteiny solubilizovat. V menší míře byl MOR také nalezen v lipidových raftech (přibližně 30% zastoupení) (Cervera et al., 2012). Výzkum byl prováděn na buňkách HEK293, kde byl pro solubilizaci použit neiontový detergent

Triton X-100. V našich experimentech byla patrná zvýšená distribuce DOR v porovnání s KOR v lipidových raftech, kde v závislosti na typu extrakčního roztoku bylo možné u těchto receptorů pozorovat jejich rovnoměrné rozdělení mezi obě frakce. V porovnání s buňkami HEK293 je distribuce DOR v membránových mikrodoménách větší ve vzorcích připravených z myokardu potkana. Při rozdělování proteinů na polyakrylamidových gelech byla zjištěna určitá menší změna mobility tohoto proteinu u supernatantu oproti peletární frakci. To může být způsobeno modifikací receptoru, která ovlivňuje distribuci mezi solubilní a nesolubilní částí membrány a může tak docházet k pomalejšímu postupu na gelu. V literatuře tento jev zdůvodňují částečnou glykosylací maturovaného receptoru, kde mobilnější obsahuje pouze jeden N-vázaný glykan oproti plně glykosylovanému receptoru, který má dva N-vázané glykany (Petäjä-Repo et al., 2006).

Protože OR transdukuje signál především přes G-proteiny inhibičního typu ($G_{i/o}$), naše práce byla zaměřena na tyto molekuly. G-protein je heterotrimetrická struktura složená kromě α podjednotky i z β a γ podjednotky, které tvoří stabilní komplex. Aktivace $G_{i/o}$ proteinů má za následek pokles aktivity AC a z toho vyplívá snížení intracelulární koncentrace cAMP. Komplex $\beta\gamma$ je v signalizaci také aktivní, a proto jsme v našich experimentech věnovali pozornost i β podjednotce G-proteinu. Obecně je známo, že G-proteiny se v určité míře nacházejí také v lipidových raftech (Foster et al., 2003). V lipidových raftech izolovaných z kardiomyocytů uhličitánovou metodou byl nalezen relativně vysoký podíl $G_{i/o}$ (Rybin et al., 2000). Současně byl pozorován poněkud nižší výskyt $G\beta$ v těchto útvech.

$G_{\alpha_{i1/2}}$ podjednotky v této práci byly detekovány ve formě dvojitého proužku na imunoblotu, přičemž silnější signál patřil $G_{\alpha_{i1}}$ a slabší signál velikostně menší $G_{\alpha_{i2}}$. Tato identifikace byla určena podle pozitivní kontroly, což byla mozková tkáň, ve které byla již dříve zjištěna přítomnost většího množství $G_{\alpha_{i2}}$ (Ihnatovych et al., 2002). Oba typy G_{α_i} podjednotek byly při analýze vzorků kontrolní skupiny a vzorků skupin ovlivněných morfinem vyhodnocovány společně. Bylo možné pozorovat rozdílné množství těchto proteinů v lipidových raftech s ohledem na použitý solubilizační roztok. U všech použitých detergentů se $G_{\alpha_{i1/2}}$ objevovaly s větší mírou mimo membránové mikrodomény. Naopak po solubilizaci uhličitánovou metodou bylo možné pozorovat převažující výskyt v lipidických doménách. Tento jev je dán většinou lokalizací $G_{\alpha_{i2}}$ právě v těchto membránových strukturách. G_{α_o} byla solubilizována pouze neiontovým Tritonem X-100. Ostatní extrakční látky neměly

dostatečnou sílu. β podjednotka obdobně jako $G\alpha_{i1/2}$ byla lokalizována po použití detergentu ve větší míře mimo membránové mikrodomény. Rozdíl lze pozorovat po použití CHAPS, kde výskyt byl přibližně rovnoměrný mezi oběma frakcemi. Analogie s $G\alpha_{i1/2}$ byla i po solubilizaci alkalickým roztokem uhličitanu sodného, kde $G\beta$ převažoval právě v izolovaných strukturách. Na rozdíl od nezměněné koncentrace zkoumaných G-proteinů po ovlivnění zvířat vysokými dávkami morfinu (10 mg/kg/den), lze v lipidových raftech pozorovat změny distribuce těchto proteinů i po aplikaci nižších dávek (Skrabalova et al., 2012). Výsledky $G\alpha_{i/o}$ v membránových mikrodoménách izolovaných uhličitanovou metodou odpovídají údajům uvedených v jedné dříve publikované studii (Rybin et al., 2000).

Hlavním efektem ovlivněným opioidní signalizací je enzym AC. Na srdci se nalézají především dvě izoformy - V a VI. V naší práci jsme kromě distribuce těchto izoform mezi lipidovými rafty a solubilizovanými proteiny zkoumali i enzymovou aktivitu tohoto proteinu. Výsledky detekce AC V/VI ukázaly zřetelný výskyt těchto proteinů v lipidových raftech, a ani při delší expozici, vyjma užití cholátu, nedošlo k zachycení enzymu mimo tyto útvary. Po solubilizaci cholátem bylo možné pozorovat přítomnost signálu i v supernatantu. Z porovnání výsledků detekce samotné AC VI, kde došlo cholátem k výrazné solubilizaci a signál byl detekován pouze v supernatantu, lze usuzovat, že signál AC V/VI v supernatantu je dán právě přítomností izoformy VI tohoto enzymu. V literatuře byla lokalizace AC V a VI v raftech dobře popsána a výsledky tohoto experimentu se dřívějšími pozorováními shodují (Ostrom et al., 2000; Rybin et al., 2000). I když byla pozorována zvýšená exprese AC V/VI vlivem aplikace vysoké dávky morfinu (10 mg/kg/den) potkanům, vliv na distribuci enzymu v lipidových raftech nebyl jednoznačně prokázán (Skrabalova et al., 2012).

Bazální a forskolinem stimulovaná enzymová aktivita AC byla zkoumána pouze ve frakcích lipidových raftů. Z důvodu nedostatku materiálu nebylo možné výsledky statisticky vyhodnotit a lze je považovat pouze za předběžné. Otázkou bylo, zda a do jaké míry solubilizací roztoky umožní stanovit aktivitu tohoto enzymu. V jedné předchozí studii byla katalytická aktivita AC v lipidových raftech sledována po solubilizaci alkalickým roztokem uhličitanu sodného (Oshikawa et al., 2003). Tento experiment probíhal na buňkách PC-12 a měřena byla inhibiční aktivita způsobena agonisty nikotinových receptorů. Z našich výsledků je patrné, že funkci enzymu nejméně ovlivňuje cholát, kdy po stimulaci forskolinem došlo až k třináctinásobnému

navýšení aktivity. Pozorována byla i určitá změna v poměru aktivit mezi kontrolní a morfinem ovlivněnými skupinami.

Předpoklad, že morfin by podobně jako některé jiné transmittery mohl způsobovat shlukování signálních proteinů do lipidových raftů, nelze jednoduše potvrdit nebo vyvrátit (Chini and Parenti, 2004). V závislosti na kontrolní skupině bylo možné pozorovat určité signifikantní změny distribuce signálních molekul, především u skupiny, které byla podávána vysoká dávka morfinu (10 mg/kg/den). Tyto změny byly rozdílné u jednotlivých proteinů, kde docházelo k nárůstu i poklesu zastoupení molekul v lipidických doménách. V získaných výsledcích hrály roli i odlišné vlastnosti použitých extrakčních látek. V závislosti na síle a odlišnosti solubilizace různými detergenty docházelo k izolaci lipidových raftů, které měly rozdílné složení. Tuto skutečnost již naznačily výsledky ze stanovení množství proteinů v izolovaných frakcích. Různé třídy membránových mikrodomén byly v literatuře také popsány a jsou pojmenovány podle solubilizační látky, pomocí které byly připraveny (Röper et al., 2000). V „Tritonových raftech“ byl po aplikaci vysoké dávky morfinu pozorován signifikantní nárůst distribuce testovaných podjednotek G-proteinu ($G\alpha_{i/o}$ a $G\beta$). U opioidních receptorů nebyla pozorována statisticky významná změna. V „CHAPS raftech“ byl také pozorován nárůst $G\alpha_i$ a $G\beta$. V těchto raftech byla zvýšená distribuce i obou detekovaných receptorů - DOR a KOR. „Cholátové rafty“ po aplikaci vysoké dávky morfinu obsahovaly nižší počet KOR i DOR, ale také $G\beta$. Naopak $G\alpha_i$ proteiny měly v tomto typu raftů zvýšenou distribuci. U „uhličitanových domén“ byl pozorován signifikantní nárůst DOR a pokles $G\alpha_i$.

Změna distribuce v lipidových raftech byla pozorována i u dalších vzorků připravených z myokardu zvířat ovlivněných morfinem. „Tritonové rafty“ po nízké aplikační dávce (0,1 mg/kg/den) morfinu byly bohatší o $G\alpha_o$ a $G\beta$. Nárůst distribuce $G\beta$ byl pozorován i v „CHAPS doménách“, v nichž se zvýšil i poměr DOR. V „cholátových raftech“ po aplikaci nízké dávky morfinu byla detekována zvýšená distribuce $G\alpha_i$ a naopak snižená distribuce KOR. V „uhličitanových doménách“ byl statisticky významný rozdíl pouze u $G\alpha_i$, kde na rozdíl od raftů po solubilizaci cholátem byla pozorována snižená distribuce.

Po aplikaci střední dávky (1 mg/kg/den) morfinu byla v „Tritonových raftech“ nalezena zvýšená distribuce $G\alpha_o$. DOR byl naopak v těchto raftech mírně snížen. V „CHAPS doménách“ nebyla při této dávce detekována žádná statisticky významná změna. Zato v „cholátových raftech“ byl pozorován výrazný pokles obou testovaných

typů OR. Na rozdíl od receptorů byla distribuce $G\alpha_i$ v tomto typu raftů výrazně navýšena. Protein $G\alpha_i$ byl po extrakci stejných vzorků uhličitánem sodným naopak solubilizován ve větší míře.

Bylo sledováno i působení vysazení morfinu (regrese) na distribuci signálních molekul v lipidových raftech. V „Tritonových raftech“ byl po týdenní regresi pozorován nárůst distribuce KOR, $G\alpha_o$ i $G\beta$. Nárůst výskytu KOR a $G\beta$ byl detekován i v „CHAPS mikrodoménách“. V „cholátových raftech“ po regresi byl jako u všech morfinových skupin pozorován pokles distribuce KOR. Naopak protein $G\alpha_i$ se v těchto strukturách nacházel ve větší míře, opět jako u všech morfinových skupin. V případě solubilizace uhličitánem nebyla u regresní skupiny pozorována žádná signifikantní změna.

7 Závěr

I když výsledky distribuce sledovaných markerů po solubilizaci jednotlivými extrakčními látkami byly velmi podobné a potvrdily úspěšnost izolace a možnost využití těchto látek k přípravě lipidových raftů, určité rozdíly v solubilizaci signálních molekul byly patrné. Nebylo zaznamenáno, že by některé ze zkoumaných signalizačních proteinů (KOR, DOR, $G\alpha_o$, $G\alpha_{i1/2}$, $G\beta$, AC V/VI) byly striktně distribuovány mimo membránové mikrodomény. Naopak, v případě detekce AC V/VI byl signál výrazně pozorován v lipidových raftech. Totéž lze říci i v případě $G\alpha_o$, kde pouze neiontový detergent Triton X-100 dokázal tuto podjednotku G-proteinu solubilizovat. Tyto výsledky se shodují s některými dříve publikovanými údaji.

Předpoklad, že morfin, podobně jako některé jiné neurotransmitery, může mít vliv na asociaci signálních molekul v lipidových raftech, byl v podstatě potvrzen. Nebyl však zjištěn žádný jednoznačný trend, neboť byla pozorována jak zvýšená tak i snížená distribuce sledovaných proteinů v membránových mikrodoménách. Získané výsledky se lišily v závislosti na detekovaném proteinu i na použitém solubilizačním roztoku, což naznačuje složitější důsledky působení morfinu na lokalizaci příslušných signálních molekul v raftech. Určité změny byly pozorovány u všech skupin zvířat, ale nejčastější signifikantní změny se nalézaly po aplikaci vysoké dávky (10 mg/kg/den) morfinu.

Studium uvedené problematiky by si zasloužilo více pozornosti i v budoucnu. Bylo by možné zaměřit se na porovnání výsledků s použitím jiných technik izolace raftů a věnovat větší pozornost kardioprotektivním účinkům morfinu. Zajímavé by bylo podrobněji analyzovat také aktivitu AC v lipidových raftech, protože v této práci z důvodu nedostatku materiálu bylo možné získat pouze předběžné výsledky. Tyto výsledky však jednoznačně naznačily, že enzymová aktivita velmi závisí na charakteru solubilizačního činidla, přičemž cholát se ukázal jako nejšetrnější. Na rozdíl od ostatních detergentů bylo možné v případě cholátu pozorovat až třináctinásobné navýšení forskolinem stimulované aktivity AC oproti aktivitě bazální.

Seznam použité literatury

- Abdulla FA, Smith PA (1997) Nociceptin inhibits T-type Ca^{2+} channel current in rat sensory neurons by a G-protein-independent mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:8721–8728.
- Balijepalli RC, Kamp TJ (2008) Caveolae, ion channels and cardiac arrhythmias. *Progress in biophysics and molecular biology* 98:149–160.
- Barrère-Lemaire S, Combes N, Sportouch-Dukhan C, Richard S, Nargeot J, Piot C (2005) Morphine mimics the antiapoptotic effect of preconditioning via an $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ signaling pathway in rat ventricular myocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 288:H83–8.
- Best JM, Kamp TJ (2012) Different subcellular populations of L-type Ca^{2+} channels exhibit unique regulation and functional roles in cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 52:376–387.
- Bian JS, Pei JM, Cheung CS, Zhang WM, Wong TM (2000) kappa -opioid receptor stimulation induces arrhythmia in the isolated rat heart via the protein kinase C/ Na^{+} - H^{+} exchange pathway. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32:1415–1427.
- Bourova L, Vosahlikova M, Kagan D, Dlouha K, Novotny J, Svoboda P (2010) Long-term adaptation to high doses of morphine causes desensitization of mu-OR- and delta-OR-stimulated G-protein response in forebrain cortex but does not decrease the amount of G-protein alpha subunits. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 16:BR260–70.
- Brodde O-E, Bruck H, Leineweber K (2006) Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *Journal of pharmacological sciences* 100:323–337.
- Brodde OE, Michel MC (1999) Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological reviews* 51:651–690.
- Brown DA, London E (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *The Journal of membrane biology* 164:103–114.
- Brown DA, Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68:533–544.
- Bünemann M, Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Roseberry AG, Hosey MM (1999) Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annual review of physiology* 61:169–192.
- Celver J, Sharma M, Kovoov A (2012) D(2)-Dopamine receptors target regulator of G protein signaling 9-2 to detergent-resistant membrane fractions. *Journal of neurochemistry* 120:56–69.

- Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Progress in neurobiology* 66:61–79.
- Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS (1999) Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* 100:2210–2212.
- Ela C, Hasin Y, Eilam Y (1993) Opioid effects on contractility, Ca(2+)-transients and intracellular pH in cultured cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 25:599–613.
- Foster LJ, De Hoog CL, Mann M (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5813–5818.
- Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL, Le Marec H (1998) The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *The Journal of clinical investigation* 102:1377–1384.
- Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews* 21:90–113.
- Goldspink PH, Russell B (1994) The cAMP response element binding protein is expressed and phosphorylated in cardiac myocytes. *Circulation research* 74:1042–1049.
- Goldstein A, Barrett RW, James IF, Lowney LI, Weitz CJ, Knipmeyer LL, Rapoport H (1985) Morphine and other opiates from beef brain and adrenal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:5203–5207.
- Gomes BA, Shen J, Stafford K, Patel M, Yoburn BC (2002) Mu-opioid receptor down-regulation and tolerance are not equally dependent upon G-protein signaling. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 72:273–278.
- Grass GD, Bratoeva M, Toole BP (2012) Regulation of invadopodia formation and activity by CD147. *Journal of cell science* 125:777–788.
- Haberstock-Debic H, Kim K-A, Yu YJ, Von Zastrow M (2005) Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:7847–7857.
- Hasbi A, Polastron J, Allouche S, Stanasila L, Massotte D, Jauzac P (1998) Desensitization of the delta-opioid receptor correlates with its phosphorylation in SK-N-BE cells: involvement of a G protein-coupled receptor kinase. *Journal of neurochemistry* 70:2129–2138.

- Head BP, Patel HH, Roth DM, Lai NC, Niesman IR, Farquhar MG, Insel PA (2005) G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 280:31036–31044.
- Henry DJ, Grandy DK, Lester HA, Davidson N, Chavkin C (1995) Kappa-opioid receptors couple to inwardly rectifying potassium channels when coexpressed by *Xenopus* oocytes. *Molecular pharmacology* 47:551–557.
- Huh J, Gross GJ, Nagase H, Liang BT (2001) Protection of cardiac myocytes via delta(1)-opioid receptors, protein kinase C, and mitochondrial K(ATP) channels. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 280:H377–83.
- Chakrabarti S, Law PY, Loh HH (1998) Distinct differences between morphine- and [D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-ol⁵]-enkephalin-mu-opioid receptor complexes demonstrated by cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation. *Journal of neurochemistry* 71:231–239.
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Yu L (1993) Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *The Biochemical journal* 295 (Pt 3:625–628.
- Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T (2004) Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* 116:565–576.
- Chini B, Parenti M (2004) G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *Journal of molecular endocrinology* 32:325–338.
- Ihnatovych I, Novotny J, Haugvicova R, Bourova L, Mares P, Svoboda P (2002) Opposing changes of trimeric G protein levels during ontogenetic development of rat brain. *Brain research Developmental brain research* 133:57–67.
- Ishikawa Y, Homcy CJ (1997) The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction. *Circulation research* 80:297–304.
- Ishikawa Y, Katsushika S, Chen L, Halnon NJ, Kawabe J, Homcy CJ (1992) Isolation and characterization of a novel cardiac adenylylcyclase cDNA. *The Journal of biological chemistry* 267:13553–13557.
- Johnson EA, Oldfield S, Braksator E, Gonzalez-Cuello A, Couch D, Hall KJ, Mundell SJ, Bailey CP, Kelly E, Henderson G (2006) Agonist-selective mechanisms of mu-opioid receptor desensitization in human embryonic kidney 293 cells. *Molecular pharmacology* 70:676–685.
- Johnson RA, Alvarez R, Salomon Y (1994) Determination of adenylyl cyclase catalytic activity using single and double column procedures. *Methods in enzymology* 238:31–56.

- Joost P, Methner A (2002) Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. *Genome biology* 3:RESEARCH0063.
- Keith DE, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin D V, Kang L, Evans CJ, Von Zastrow M (1996) Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *The Journal of biological chemistry* 271:19021–19024.
- Kilpatrick GJ, Smith TW (2005) Morphine-6-glucuronide: actions and mechanisms. *Medicinal research reviews* 25:521–544.
- Koch T, Höllt V (2008) Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacology & therapeutics* 117:199–206.
- Koch T, Krosiak T, Averbeck M, Mayer P, Schröder H, Raulf E, Höllt V (2000) Allelic variation S268P of the human mu-opioid receptor affects both desensitization and G protein coupling. *Molecular pharmacology* 58:328–334.
- Koch T, Widera A, Bartsch K, Schulz S, Brandenburg L-O, Wundrack N, Beyer A, Grecksch G, Höllt V (2005) Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Molecular pharmacology* 67:280–287.
- Koch T, Wu D-F, Yang L-Q, Brandenburg L-O, Höllt V (2006) Role of phospholipase D2 in the agonist-induced and constitutive endocytosis of G-protein coupled receptors. *Journal of neurochemistry* 97:365–372.
- Krupinski J, Lehman TC, Frankenfield CD, Zwaagstra JC, Watson PA (1992) Molecular diversity in the adenylyl cyclase family. Evidence for eight forms of the enzyme and cloning of type VI. *The Journal of biological chemistry* 267:24858–24862.
- Kuo JF, Greengard P (1970) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. 8. An assay method for the measurement of adenosine 3',5'-monophosphate in various tissues and a study of agents influencing its level in adipose cells. *The Journal of biological chemistry* 245:4067–4073.
- Kuschel M, Zhou YY, Cheng H, Zhang SJ, Chen Y, Lakatta EG, Xiao RP (1999) G(i) protein-mediated functional compartmentalization of cardiac beta(2)-adrenergic signaling. *The Journal of biological chemistry* 274:22048–22052.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Laurent S, Marsh JD, Smith TW (1986) Enkephalins increase cyclic adenosine monophosphate content, calcium uptake, and contractile state in cultured chick embryo heart cells. *The Journal of clinical investigation* 77:1436–1440.
- Levac BAR, O'Dowd BF, George SR (2002) Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units. *Current opinion in pharmacology* 2:76–81.

- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267:495–499.
- Luo D, Gao J, Lan X, Wang G, Wei S, Xiao R, Han Q (2006) Role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in α 1-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Acta pharmacologica Sinica* 27:895–900.
- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377:532–535.
- Minoia P, Sciorsci RL (2001) Metabolic control through L calcium channel, PKC and opioid receptors modulation by an association of naloxone and calcium salts. *Current drug targets Immune, endocrine and metabolic disorders* 1:131–137.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS letters* 341:33–38.
- Morris AJ, Malbon CC (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiological reviews* 79:1373–1430.
- Neri C, Ghelardini C, Sotak B, Palmiter RD, Guarna M, Stefano G, Bianchi E (2008) Dopamine is necessary to endogenous morphine formation in mammalian brain in vivo. *Journal of neurochemistry* 106:2337–2344.
- Oshikawa J, Toya Y, Fujita T, Egawa M, Kawabe J, Umemura S, Ishikawa Y (2003) Nicotinic acetylcholine receptor α 7 regulates cAMP signal within lipid rafts. *American journal of physiology Cell physiology* 285:C567–74.
- Ostrom RS, Bogard AS, Gros R, Feldman RD (2012) Choreographing the adenylyl cyclase signalosome: sorting out the partners and the steps. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 385:5–12.
- Ostrom RS, Violin JD, Coleman S, Insel PA (2000) Selective enhancement of beta-adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6: colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes. *Molecular pharmacology* 57:1075–1079.
- Patel MB, Patel CN, Rajashekara V, Yoburn BC (2002) Opioid agonists differentially regulate μ -opioid receptors and trafficking proteins in vivo. *Molecular pharmacology* 62:1464–1470.
- Peart JN, Hoe LES, Gross GJ, Headrick JP (2011) Sustained ligand-activated preconditioning via δ -opioid receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 336:274–281.
- Pepe S, Xiao RP, Hohl C, Altschuld R, Lakatta EG (1997) “Cross talk” between opioid peptide and adrenergic receptor signaling in isolated rat heart. *Circulation* 95:2122–2129.

- Pesanová Z, Novotný J, Cerný J, Milligan G, Svoboda P (1999) Thyrotropin-releasing hormone-induced depletion of G(q)alpha/G(11)alpha proteins from detergent-insensitive membrane domains. *FEBS letters* 464:35–40.
- Petäjä-Repo UE, Hogue M, Leskelä TT, Markkanen PMH, Tuusa JT, Bouvier M (2006) Distinct subcellular localization for constitutive and agonist-modulated palmitoylation of the human delta opioid receptor. *The Journal of biological chemistry* 281:15780–15789.
- Piros ET, Prather PL, Law PY, Evans CJ, Hales TG (1996) Voltage-dependent inhibition of Ca²⁺ channels in GH3 cells by cloned mu- and delta-opioid receptors. *Molecular pharmacology* 50:947–956.
- Poole AW, Pula G, Hers I, Crosby D, Jones ML (2004) PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *Trends in pharmacological sciences* 25:528–535.
- Port JD, Bristow MR (2001) Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 33:887–905.
- Puttfarcken PS, Cox BM (1989) Morphine-induced desensitization and down-regulation at mu-receptors in 7315C pituitary tumor cells. *Life sciences* 45:1937–1942.
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T (1994) Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Molecular pharmacology* 45:330–334.
- Resh MD (2004) Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Sub-cellular biochemistry* 37:217–232.
- Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 415:206–212.
- Röper K, Corbeil D, Huttner WB (2000) Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nature cell biology* 2:582–592.
- Rozec B, Gauthier C (2006) beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacology & therapeutics* 111:652–673.
- Rubin D, Ismail-Beigi F (2003) Distribution of Glut1 in detergent-resistant membranes (DRMs) and non-DRM domains: effect of treatment with azide. *American journal of physiology Cell physiology* 285:C377–83.
- Rump LC, Riera-Knorrenschild G, Schwertfeger E, Bohmann C, Spillner G, Schollmeyer P (1995) Dopaminergic and alpha-adrenergic control of neurotransmission in human right atrium. *Journal of cardiovascular pharmacology* 26:462–470.

- Rybin VO, Xu X, Lisanti MP, Steinberg SF (2000) Differential targeting of beta -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 275:41447–41457.
- Salani B, Briatore L, Contini P, Passalacqua M, Melloni E, Paggi A, Cordera R, Maggi D (2009) IGF-I induced rapid recruitment of integrin beta1 to lipid rafts is Caveolin-1 dependent. *Biochemical and biophysical research communications* 380:489–492.
- Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Díaz M, DeAntonio I, Garzón J (1999) Endomorphin-1 and endomorphin-2 show differences in their activation of mu opioid receptor-regulated G proteins in supraspinal antinociception in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 291:12–18.
- Sato M, Minami M (1995) Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacology & therapeutics* 68:343–364.
- Shogomori H, Brown DA (2003) Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biological chemistry* 384:1259–1263.
- Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:131–135.
- Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP (1995) Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *The Journal of biological chemistry* 270:16395–16401.
- Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K (2003) Resistance of cell membranes to different detergents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5795–5800.
- Schulz S, Mayer D, Pfeiffer M, Stumm R, Koch T, Höllt V (2004) Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375. *The EMBO journal* 23:3282–3289.
- Skomedal T, Borthne K, Aass H, Geiran O, Osnes JB (1997) Comparison between alpha-1 adrenoceptor-mediated and beta adrenoceptor-mediated inotropic components elicited by norepinephrine in failing human ventricular muscle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 280:721–729.
- Skrabalova J, Neckar J, Hejnova L, Bartonova I, Kolar F, Novotny J (2012) Antiarrhythmic effect of prolonged morphine exposure is accompanied by altered myocardial adenylyl cyclase signaling in rats. *Pharmacological reports: PR* 64:351–359.

- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150:76–85.
- Song KS, Li Shengwen, Okamoto T, Quilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti MP (1996) Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *The Journal of biological chemistry* 271:9690–9697.
- Sonnino S, Prinetti A (2013) Membrane domains and the “lipid raft” concept. *Current medicinal chemistry* 20:4–21.
- Standifer KM, Pasternak GW (1997) G proteins and opioid receptor-mediated signalling. *Cellular signalling* 9:237–248.
- Standifer KM, Rossi GC, Pasternak GW (1996) Differential blockade of opioid analgesia by antisense oligodeoxynucleotides directed against various G protein alpha subunits. *Molecular pharmacology* 50:293–298.
- Staubach S, Hanisch F-G (2011) Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert review of proteomics* 8:263–277.
- Stefano GB, Goumon Y, Casares F, Cadet P, Fricchione GL, Rialas C, Peter D, Sonetti D, Guarna M, Welters ID, Bianchi E (2000) Endogenous morphine. *Trends in neurosciences* 23:436–442.
- Tallent M, Dichter MA, Bell GI, Reisine T (1994) The cloned kappa opioid receptor couples to an N-type calcium current in undifferentiated PC-12 cells. *Neuroscience* 63:1033–1040.
- Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *The Journal of biological chemistry* 271:2255–2261.
- Taylor SS, Yang J, Wu J, Haste NM, Radzio-Andzelm E, Anand G (2004) PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochimica et biophysica acta* 1697:259–269.
- Thakker DR, Standifer KM (2002) Induction of G protein-coupled receptor kinases 2 and 3 contributes to the cross-talk between mu and ORL1 receptors following prolonged agonist exposure. *Neuropharmacology* 43:979–990.
- Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, Ghini AS, Ferri C, Desideri G, Chiariello L, Gioffré PA (1999) Effects of naloxone on myocardial ischemic preconditioning in humans. *Journal of the American College of Cardiology* 33:1863–1869.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350–4354.

- Ventura C, Spurgeon H, Lakatta EG, Guarnieri C, Capogrossi MC (1992) Kappa and delta opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca²⁺ release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circulation research* 70:66–81.
- Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL (2004) Opioid receptors. *Annual review of biochemistry* 73:953–990.
- Wang GY, Wu S, Pei JM, Yu XC, Wong TM (2001) Kappa- but not delta-opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 280:H384–91.
- Wang Z, Sadée W (2000) Tolerance to morphine at the mu-opioid receptor differentially induced by cAMP-dependent protein kinase activation and morphine. *European journal of pharmacology* 389:165–171.
- Wittert G, Hope P, Pyle D (1996) Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochemical and biophysical research communications* 218:877–881.
- Xu W, Yoon S-I, Huang P, Wang Y, Chen C, Chong PL-G, Liu-Chen L-Y (2006) Localization of the kappa opioid receptor in lipid rafts. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 317:1295–1306.
- Yabaluri N, Medzihradsky F (1997) Down-regulation of mu-opioid receptor by full but not partial agonists is independent of G protein coupling. *Molecular pharmacology* 52:896–902.
- Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI (1993) Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:6736–6740.
- Zadina JE, Kastin AJ, Harrison LM, Ge LJ, Chang SL (1995) Opiate receptor changes after chronic exposure to agonists and antagonists. *Annals of the New York Academy of Sciences* 757:353–361.
- Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Bodduluri SR, Laporte SA, Law PY, Caron MG (1998) Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:7157–7162.
- Zhang WM, Wong TM (1998) Suppression of cAMP by phosphoinositol/Ca²⁺ pathway in the cardiac kappa-opioid receptor. *The American journal of physiology* 274:C82–7.
- Zhao F, Zhang J, Liu Y-S, Li L, He Y-L (2011) Research advances on flotillins. *Virology journal* 8:479.

Zimlichman R, Gefel D, Eliahou H, Matas Z, Rosen B, Gass S, Ela C, Eilam Y, Vogel Z, Barg J (1996) Expression of opioid receptors during heart ontogeny in normotensive and hypertensive rats. *Circulation* 93:1020–1025.